



TITLE:

転写因子PEBP2 α , β サブユニットの機能解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

鹿児島, 浩

CITATION:

鹿児島, 浩. 転写因子PEBP2 α , β サブユニットの機能解析. 京都大学, 1996, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1996-01-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3108328>

RIGHT:

許諾条件により本文は2011-02-11に公開

転写因子PEBP2 α 、 β サブユニットの機能解析

生物物理学専攻
鹿児島 浩

目次

第一章 序論	1
第二章 材料と方法	14
第1節 実験材料	14
第2節 実験方法	15
第三章 結果	25
第1節 PEBP2 α サブユニットcDNAのクローニングと 塩基配列の決定	25
第2節 α 、 β サブユニットの分子機能解析	36
第3節 酸化還元制御による runt domain の活性調節	55
第四章 考察	63
第1節 PEBP2 α サブユニットのアミノ酸配列	64
第2節 PEBP2 α 、 β サブユニットの機能領域	69
第3節 PEBP2 α サブユニットによるDNAの認識機構	83
第4節 PEBP2 α 、 β サブユニットの生体内での役割	93
謝辞	102
参考文献	103

第一章 序論

真核生物、原核生物を問わずあらゆる生物が自己を保存して行くために最も重要なことの一つは、遺伝子発現の調節であると言える。中でも多細胞生物の遺伝子発現は、発生の各段階によって(時間的に)、またさらに異なる組織ごとに(空間的に)多様な、特異的な調節を受ける。遺伝子発現の調節はDNAからRNAへの転写、RNAのプロセッシング、核内から細胞質へのmRNAの輸送、mRNAの安定性、蛋白質への翻訳、蛋白質の修飾などの様々な段階で起こる。しかし、非常に多くの場合、基本的な制御は主に転写段階でなされることが明らかになっている。

原核生物の転写は一種類のポリメラーゼによって行われ、転写開始の調節はプロモーターとよばれる主に転写開始点の10bp、35bp上流にある二つの調節領域を中心に行なわれている。これらはそれぞれ-10、-35ボックスとして知られ遺伝子間、種間で強く保存されている。転写活性は最も単純には、プロモーター配列とRNAポリメラーゼとの親和性によって調節されているが、負の調節タンパク(リプレッサー)がオペレーターに結合することによって、プロモーター配列とRNAポリメラーゼの結合が阻害され、転写活性が減少することが明らかになっている。また、逆に正の調節タンパク(アクチベーター)の結合は、プロモーター配列とRNAポリメラーゼの結合を促進し、転写活性の増加が起こる(図1A、[Watson et al., 1988]より改変)。一方、真核生物にはPol I、Pol II、Pol IIIと名付けられた三種類のRNAポリメラーゼがあり、それぞれ主にrRNA、mRNA、tRNAの転写を行う。これらの転写は原核生物同様のプロモーター配列に加えて、遺伝子上流、下流、あるいは内部など様々な位置にあるエンハンサー配列によっても制御される。これらの制御配列は、多種多様な6-20bpの配列単位(エレメント)の集合からなり、各々のエレメントに特異的な転写因子が結合する(図1B、[Mitchel & Tjian 1989]より改変)。この中で最も動的に遺伝子発現の制御が行われているPol IIでは、転写開始複合体の形成は、第一にTATA結合蛋白質(TBP: TATA Binding Protein)が複数のTBP関連因子(TAFs: TBP

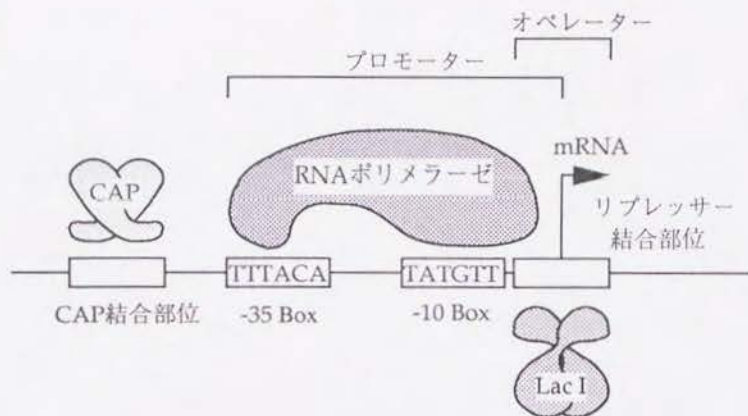
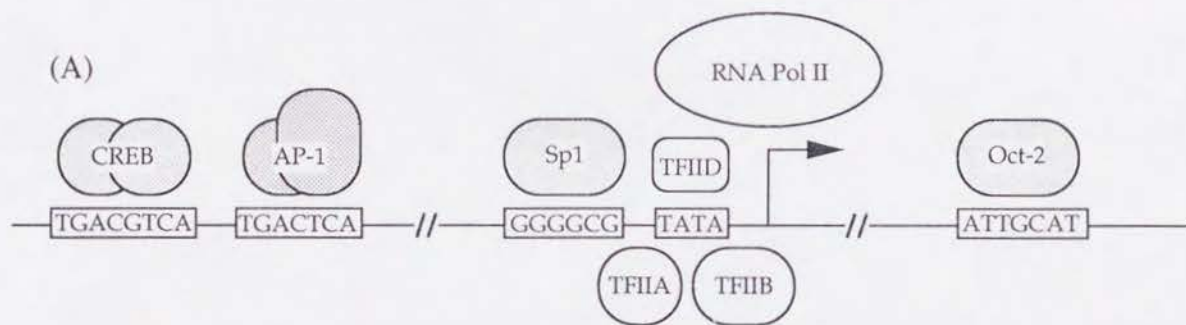


図1A 原核生物の転写制御
- ラクトース遺伝子の転写制御領域 -

Lacリプレッサー(Lac I)はオペレーターへの結合により、RNAポリメラーゼのプロモーター領域への結合を阻害し、転写を抑制する。逆にCAP蛋白質はポリメラーゼのプロモーターへの結合を促進することによって転写の活性化を行う。



(B)

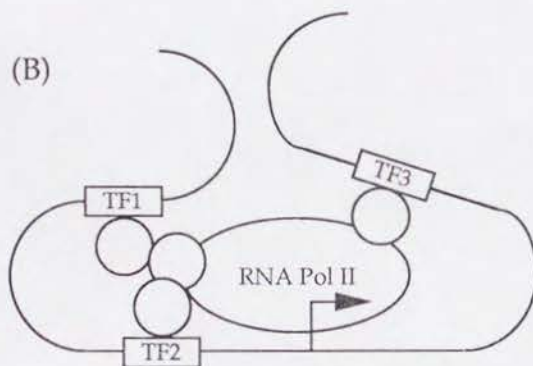


図1B 真核生物の転写調節

真核生物の転写は、転写開始点の比較的近傍にある調節領域プロモーターと、遠くに位置するエンハンサーの両方によって複雑に調節されている。これらはエレメントに結合する転写因子同志、またはポリメラーゼ複合体との蛋白質-蛋白質相互作用、DNAへの屈曲の導入などによって、より高次の転写開始複合体を形成すると考えられている。

associated factors) を伴ってTFIID と呼ばれる複合体を形成し、これがプロモーター配列を認識し、結合することによって始まる。その後TFIIB、TFIIAがプロモーター上にあるTFIIDと結合し、続いてTFIIF / Pol II複合体が、さらにTFIIE、TFIIIG、TFIIHが順に結合し完全な転写開始複合体の形成が起こり、転写が開始する(図1C、[Zawel & Reinberg 1992]より改変)。

エンハンサー、プロモーターに含まれるエレメントの種類や数は遺伝子によってそれぞれ独特であり、これらの組み合わせによって高度な遺伝子発現の調節が可能になっている。また同じエンハンサーであってもその活性は細胞種によって大きく異なり、一方同じ細胞であってもその発生段階によって活性が大きく変化する。これらの差は、主に細胞の種類、発生段階によって含まれるエンハンサー結合因子の種類とその組み合わせ、またその量的な差異に起因すると考えられる。さらには転写活性化因子として知られているエンハンサーであっても、他の転写因子との組み合わせやDNA上の位置などによっては、むしろ転写を抑制するサイレンサーとしても働きうる例が知られている。一般に、エンハンサー群がある遺伝子の転写活性におよぼす効果は、促進効果と抑制効果の兼ね合いで決まる。

転写制御因子はエンハンサー配列に結合することによって、その配列の支配を受けるプロモーターからの転写活性を調節する。転写制御因子の結合による、転写活性化は現在、1. TFIIDを初めとする基本転写因子群のプロモーター領域への結合促進、2. プロモーターと転写開始複合体の結合の安定化、3. ATPなどの加水分解のエネルギーによるDNA二本鎖の解裂促進、4. クロマチン構造形成の阻害やその緩和、5. DNAへのベンディング、ルーピングの導入による他の転写制御因子の集合促進、などの機構によって行われていると考えられている。

遺伝子発現制御の根幹をなす転写の調節は、様々に異なる転写制御因子群によって行われている。転写制御因子の種類はすでに多数が同定され、データベースに登録されているものだけでも500を超えている。しかし、一見、手のつけどころがないほどに雑多なこれら転写制御因子も、構造的には十数種類あまりのクラスに整理できることがわかっ

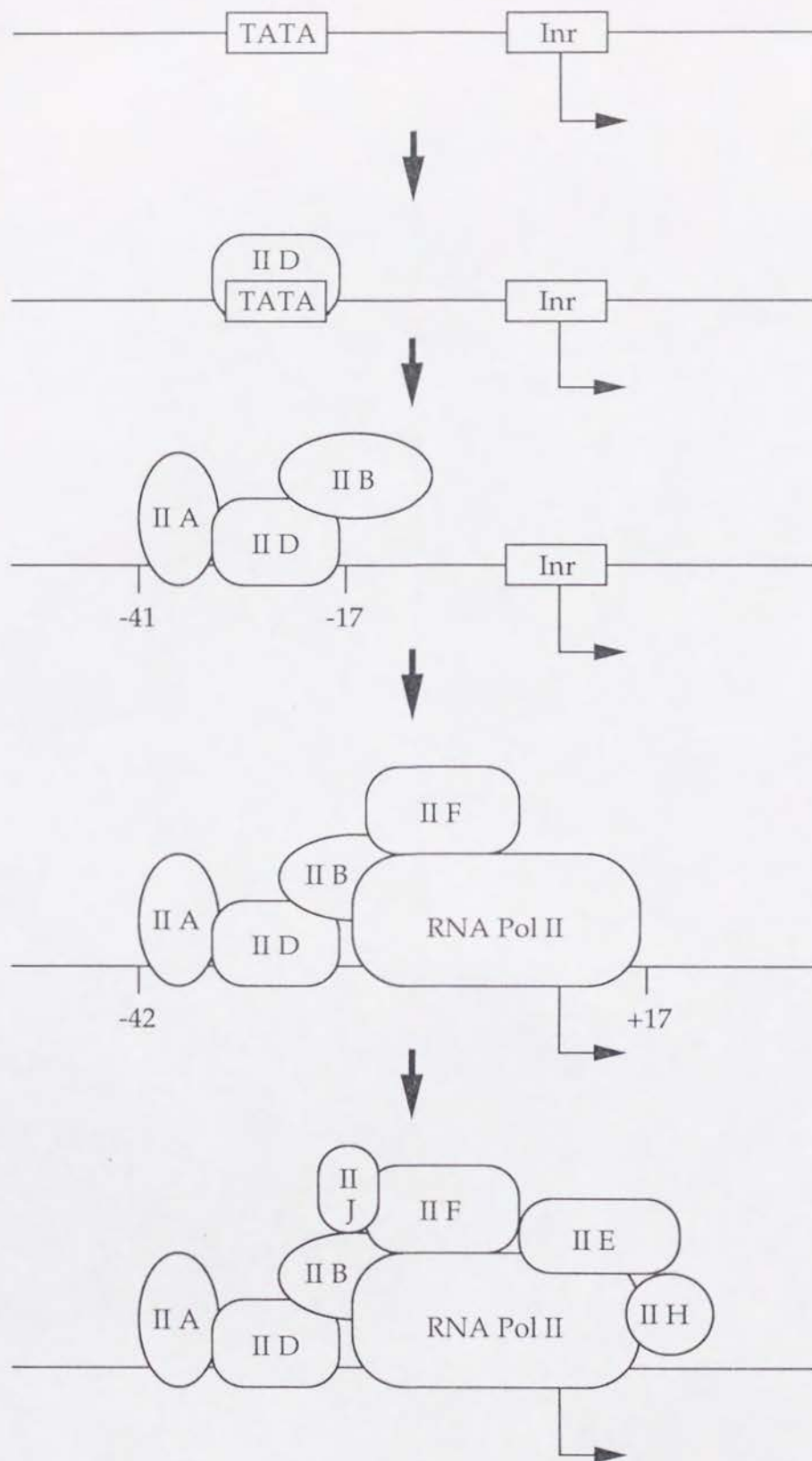


図1C 転写開始複合体の形成

図中の略号はそれぞれ次のものを示す(TATA: TATA配列、Inr: イニシエーター配列、カギつき矢印: 転写開始点、IIA: TF IIA、IIB: TF IIB、IID: TF IID、IIE: TF IIE、IIF: TF IIF、IIH: TF IIH、IIJ: TF IIJ、RNA Pol II: RNAポリメラーゼII)。また、書き込んである数字は、それぞれの段階の複合体によって生じるフットプリントの位置を示す(単位は転写開始点からの塩基数)。

てきた。その代表例として、ロイシンジッパー、Znフィンガー、ヘリックス-ループ-ヘリックス、ホメオボックスなどが最も有名であり、またそれぞれ非常に多数のメンバーを含んでいる。これらは各クラスごとに主要な構造的・機能的性質—蛋白質構造モチーフ、認識配列、結合様式、転写活性化の機構、DNA構造への影響など—に関して特有の性格を示す。そうしてそれらはさらにお互い同士の相互作用を通じて、複雑で高度な制御ネットワークを作り上げている。それぞれの転写因子は、いわば劇中における様々な配役に例えることができる。それぞれの役割は、登場する場面や重みこそ違い、劇の進行と色付けに一つとして欠かすことはできない。現在でも転写因子にはまだ解明されていないものが多数あると思われるが、こうした意味においても存在するすべてのクラスおよびメンバーを調べ尽くして行くことが遺伝子発現制御の多様性、またその機構の全体像を解明するために必要であると考えられる。

我々のグループは、細胞の分化、癌化に関与した遺伝子発現の調節機構を明らかにするために、ポリオーマウイルスを一つのモデルとして機能解析を行ってきた。ポリオーマウイルスはSV40とともにパポバウイルス科の亜科に分類され、ゲノムとして5,292 bpの2本鎖環状DNAを持つ。ポリオーマウイルスDNAの複製開始点付近には、エンハンサーエレメントが集中しており、この領域を中心として時計まわりに初期遺伝子の、反時計まわりに後期遺伝子の転写が起こる(図1D、[O'Brien 1984])。

約240bpからなるエンハンサー領域は初期・後期遺伝子の転写のみならず、ウイルスDNAの複製においても必須であり、また複製、転写の活性化に必要な領域は大部分共通している。この領域をサルのウイルスであるSV40にある72bpリピートエンハンサーに置換すると、本来ポリオーマウイルスは増殖できないサルの細胞内で複製が行なえるようになる。また同様にIgMエンハンサー領域に置換すると非許容宿主であるリンパ球での複製が可能になる。このことから、転写と複製の間には密接な関係があり、エンハンサーは直接、あるいは間接に複製の制御を行なっている可能性が考えられる[de Villiers et al., 1984, Veldman et al., 1985, Hassell et al., 1986]。

ポリオーマウイルスはF9、PCC4などの胚性幹細胞ではエンハンサー活性が十分に機能しないためこれらの細胞では増殖できない、しかし上皮細胞、繊維芽細胞などの分化の進んだ細胞、あるいはレチノイン酸、cAMPなどで分化を誘導したdF9細胞中で初めてエンハンサー活性を示すようになり、これらの細胞中でよく増殖できるようになる。これに対して、本来なら増殖できない細胞中でも増殖できるようになった変異ポリオーマウイルスの配列を解析すると、点変異や重複、欠損変異はエンハンサー領域に集中しており、この領域がウイルスの宿主域を遺伝的に規定していることが明らかになった。このことから、エンハンサー領域内にその活性を正あるいは負に制御するエレメントが複数存在しており、これに対する制御因子の種類や量が、細胞の分化段階によって変動していることがわかった。以上によって、ポリオーマウイルスエンハンサーは、細胞分化に関わる制御因子の解析に非常に有効な材料であると考えられる。さらに注目されることとして、ポリオーマウイルスエンハンサーは、癌遺伝子や発癌プロモーターTPAによって、活性が上昇・抑制される。HeLa、L細胞においてポリオーマウイルスエンハンサーの活性は、アデノウイルスのトランスフォーミング遺伝子E1Aによって抑えられ、癌遺伝子Ha-rasやTPAはエンハンサー活性の上昇を促す。これは癌遺伝子や発癌プロモーターが発する細胞増殖シグナルによって、エンハンサー結合因子が調節されていることを示す。以上によって、これらポリオーマウイルスエンハンサーに結合する因子群は、細胞内シグナル伝達系における最終到達点となっていることが示唆された。

Veldmanらは、COP5細胞(繊維芽細胞由来)において、エンハンサー欠損のパターンとウイルスDNA複製の間の関係を解析し、このエンハンサー領域を4つの機能領域(A, B, C, Dエレメント)に分けた。彼らはさらに24bpからなるAエレメントが単独で、転写・複製の活性化を行なえることを明らかにした[Verdman et al., 1985]。この時、Aエレメントは1コピーでは微弱な活性しか持たなかったが、3-4コピーになると全エンハンサー活性の約30%、7コピーではさらに高い活性を示した。また、核内存在下のポリオーマウイルスDNAのDNaseIに対する感受性は、エンハンサー領域で全体的に高くなっており、特にA、Bエレメントには切断を受けやすい領域が存在している。このことから、A、Bエ

レメントの領域ではヌクレオソーム構造が開いて、転写因子との相互作用が起こっていると考えられる。さらに、宿主域の変化した変異型ウイルスでは、Aエレメントの重複が起こっていることが多く、この領域が転写の活性化に働く制御因子の結合部位となっていると予想される。以上の結果から我々は、ポリオーマウイルスエンハンサーの活性に最も重要な領域としてAエレメントに注目し、この領域に結合する因子の同定を進めてきた(図1E、[Satake et al., 1992]より改変)。繊維芽細胞NIH3T3からの核抽出液を用い、Aエレメントをプローブとしてゲルシフト解析を行なったところ、このエレメントには5つの転写因子(PEBP1-5)が結合することがわかった。PEBP1の結合配列はAP-1の結合配列コンセンサスと一致し、またTPAによってその活性が上昇することからPEBP1はマウス細胞におけるAP1に相当する因子であると考えられる[Furukawa et al., 1990]。PEBP4は唯一未分化細胞から検出できる因子で、転写を抑制的に制御する働きを持つと考えられている。またこの因子は結合配列がPEBP1、2と重なっているため、これらと競合的にDNAに結合するものと推測されている。PEBP5はEtsファミリーに属する転写因子であり、この因子が結合する配列に変異を導入すると、ウイルスの感染性が著しく減少することが示されている。

PEBP2/3は、未分化細胞であるF9細胞ではほとんど検出されないが、レチノイン酸による分化の誘導に伴ってPEBP1(AP-1)やPEBP5(Ets)とともに検出されるようになる。この発現パターンはポリオーマウイルスのエンハンサーがF9やPCC4などの未分化な胚性癌腫(EC)細胞や栄養芽細胞などでは十分に機能せず、これらをレチノイン酸やcAMPによって分化を誘導することによって機能が活性化する事実と符合する[Fujimura et al., 1981, Katinka et al., 1980, Sekikawa & Levine 1981, Tanaka et al., 1982]。また、NIH3T3細胞の核抽出液に含まれるPEBP2/3はをゲルシフト法によって解析すると、Ha-rasによるトランスフォームする前は、移動度の小さいPEBP2型のバンドを生じ、トランスフォーム後には移動度が大きなPEBP3型のバンドを生じる[Sateke et al., 1988]。PEBP2とPEBP3は当初、その分子的挙動の差が大きいことから別々の因子ではないかと推測されていたが、

全く同一の配列を認識すること、酸性脱リン酸化酵素で処理したPEBP2を用いてゲルシフト解析を行うとPEBP3と同様の位置にシフトバンドを形成することから[Satake et al., 1989]、これらは同一のペプチドを共有するものと予想された。分子的挙動の差異は、初めリン酸化状態の違い、もしくは他の会合因子によって生じるものではないかと考えられたが、現在はcDNAクローニングの解析から蛋白質分解酵素による蛋白質分解によってPEBP2/3の間の差異が生じることがほぼ確定している[Takahashi et al., 未発表]。これらのことから、PEBP2/3を代表して以下PEBP2とする。これらの観察からPEBP2は、rasシグナル伝達系における最終標的の一つになっていると考えられ、細胞分化、増殖の制御において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、これまで解析された因子で、PEBP2配列に特異的に結合するものは知られていないことから、この因子は新しい転写制御因子であると考えられた。そこで我々のグループは、このユニークな転写制御因子PEBP2の分子的本性と、この因子が担う役割とを明らかにすることを目指して研究を進めてきた。

PEBP2の分子的解析を目指して、Kamachiらは*Ha-ras*によってトランスフォームしたNIH3T3細胞をヌードマウスに接種して腫瘍を作らせ、AコアDNAによる親和性クロマトグラフィーを用いてこの核抽出液からPEBP2を精製し、その分子的性質を詳しく解析した[Kamachi et al., 1990]。その結果、PEBP2は分子量が異なる二種類のサブユニット、 α (30-35kDa)、 β (20-25kDa)からなることが明らかになった。これらの各サブユニットはどちらも、見かけの大きさが少しずつ違う数個のサブタイプを含んでいた。各サブタイプはすべて単独でDNA結合活性を持つこと(但し、後述するように、これは一部修正を要する)、また、 α サブユニット、 β サブユニットは同種間よりも異種間でより強く会合することがわかった。この観察から、 α サブユニットと β サブユニットが一つずつ組み合わさったヘテロダイマーが、もとのPEBP2に他ならないことが示された。また、精製されたPEBP2を用いたメチル化阻害フットプリンティング、DNaseIフットプリンティングによって、その認識結合配列がR/TACCRCA (Rはプリン塩基)であり、またポリオーマウイルスエンハンサーのAコアのGACCGCA (nt 5125 - 5131)、およびBコアのTGTGGTT

(nt 5191-5197、相補鎖の配列は5'からAACCACA)に特異的に結合することが確認された。

Ogawaらは、これら精製された蛋白質から得た5つのペプチド配列のうち2つの配列をもとにcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、 β サブユニットcDNAのクローニングに成功した[Ogawa et al., 1993b]。これによって β サブユニットはディファレンシャルスプライシングに起因する3つのタイプのcDNA($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$)によってコードされていることが明らかになった。 β サブユニットは既知の蛋白質との相同性を持たず、またその配列中にはロイシンジッパー、ホメオドメイン、ヘリックスループヘリックスなどのDNA結合、タンパク-タンパク相互作用などの機能モチーフもなかった。この遺伝子をもとに産生した β サブユニットは単独ではDNAに結合しなかったが、 α サブユニットとヘテロダイマーを形成して、 α サブユニット単独よりも安定なDNAとの複合体を形成することが示された。なお、Kamachiらの論文で、 β サブユニットも単独でDNAに結合するように報告したが、のちに厳密な精製を行うことによって、この時の β サブユニット標品にはごくわずかに α サブユニットが混入していたことが判った。

そこでさらに、残る3つのペプチド配列をもとに引き続きcDNAのスクリーニングを行い、 α サブユニットcDNAのクローニングに成功した[Ogawa et al., 1993a]。 α サブユニットの塩基配列から予測されるアミノ酸配列を調べたところ、128アミノ酸の領域においてショウジョウバエの分節化遺伝子*runt*、およびヒトの急性骨髄性白血病関連遺伝子AML1遺伝子と極めて高い相同性を共有していることが明らかになった(図1F、[Kagoshima et al., 1993])。我々はこの領域をRunt domainと名付けた。この発見によってRuntファミリーという新しい転写因子族の存在が明らかにされた。

*runt*は初めショウジョウバエ胚の分節化制御に重要な役割を担う遺伝子として同定されたが[Ingham et al., 1988]、その後さらに性決定[Duffy et al., 1991a]、神経系形成の制御[Duffy et al., 1991b]にも関与していることが明らかにされた。この遺伝子の失活変異が生じると胚分節の欠失が生じるため、ショウジョウバエは「ちびすけ(*runt*)胚」の形態を取り、胚致死となる。この遺伝子はショウジョウバエの胚発生過程において多核性胞

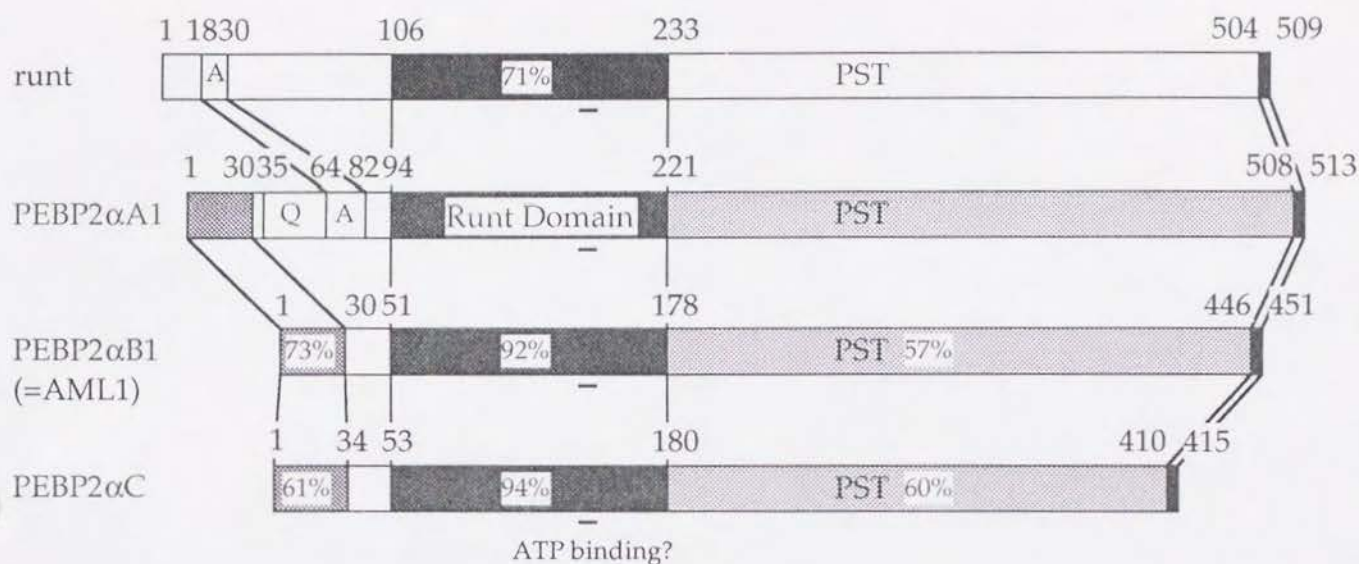


図1F Runtファミリー蛋白質の構造比較

Polyomavirus enhancer

A core	CT	GACCGCA	GC
B core	AA	AACCACA	CT

MuLV LTR

SL3-3	TT	AACCACA	GA
Moloney	CT	TACCACA	GA

T cell specific genes

mouse TCR β	CA	AACCACA	TC
mouse TCR γ	AA	GACCACA	GC
human CD3 ε	TT	AACCACA	GC

Consensus sequence

R	A	C	C	R	C	A
T						

図1G PEBP2の認識配列

胚期の第13分裂期から転写が開始され、細胞性胚期へとスイッチする第14分裂期においては7本のストライプ状に発現する。同じペアルール遺伝子の*hairy*も同様に7本のストライプ状の発現を見せるが*runt*とは重なりあわないようになっている。これはこれら2つの遺伝子が、お互いに抑制しあっているためにおこると考えられている。また、*even-skipped*、*fushi-tarazu*も同様の7本のストライプ状の発現をするが*even-skipped*は*runt*の前半分と、*fushi-tarazu*は後ろ半分と重なりあった形で発現する。*runt*は、この二つの遺伝子にたいしてそれぞれ*even-skipped*を抑制的、*fushi-tarazu*を促進的に制御すると考えられている[Gergen & Butler 1988, Ingham & Gergen 1988, Kania et al., 1990, Gilbert 1991]。

AML1はヒトの急性骨髄性白血病のFAB分類M2型のなかで最も高頻度で見出されるt(8;21) 染色体転座部位に存在する遺伝子である。この染色体転座ではAML1は、Znフィンガーモチーフをもつ遺伝子MTG8との融合蛋白質として発現している[Miyoshi et al., 1991]。この融合遺伝子のアンチセンスオリゴによる発現の抑制により白血病細胞の増殖が止まることなどから、これがこの疾患の直接の原因であると考えられる[Sakakura et al., 1994]。また慢性骨髄性白血病におけるt(3;21) 染色体転座でもAML1が別のZnフィンガーモチーフをもつEvi-1遺伝子と融合していることが知られている[Mitani et al., 94]。

その後、 α Aサブユニットをプローブとした交差ハイブリダイゼーションによって、マウスB細胞、およびヒトのT細胞のcDNAライブラリーからそれぞれ α B[Bae et al., 1993]、 α C[Bae et al., 1995]がクローニングされ、これらも*runt*、AML1との間にRunt domainを共有していることがわかった。特に α Bサブユニットは、その96 %がAML1と同一のアミノ酸であり、これはAML1のマウスホモログであると考えられる。ノーザンブロッティング解析によりこれら3つの遺伝子はそれぞれ特徴的な組織特異的発現を示すことがわかった。まず α AはT cell およびNIH3T3で発現しており、 α Bは血球系の細胞全般に発現し、 α Cは普遍的な発現を示す。これらの発現パターンから α AはT細胞、 α Bはリンパ細胞の分化、増殖の制御を行っている可能性が示唆された。このことはPEBP2認識配列であるR/TACCRCAが、T細胞受容体(TCR)エンハンサー領域や、CD2、CD3などの血球系に特異的な遺伝子の転写制御領域に多く見出さることからも支持され

る(図1G、[Satake et al., 1992]より改変)。またさらに α サブユニットとショウジョウバエのruntとの高度な保存性から、その標的遺伝子についても保存されている可能性が考えられ、この因子は神経細胞の分化、増殖にも関与する可能性もある。

本論文では、私は最初 α サブユニットのcDNAクローニングを行ったのを出発点として、このサブユニットの担う役割について研究してきたが、特にRunt domainの発見をきっかけにこの領域の分子機能に焦点を絞って解析を進めた。その手段として欠損変異を用いた機能ドメイン解析を行い、Runt domainが特異的DNA結合能および β サブユニットとのヘテロ二量体形成能を合わせ持つ最小機能単位であることを示した。この結果からRunt domainはロイシンジッパー、Znフィンガー、ヘリックス-ループ-ヘリックス、ホメオボックスなどと比肩されるべき新規の構造モチーフであることが示された。これによって、それまで分子的機能が長らく不明であったruntおよびAML1が転写因子であり、 β サブユニットと対になって機能することが明らかになった。さらにこの結果から、これらの因子の分子的研究の展望が初めて開け、Runtファミリーの持つ進化的、生物学的重要性が大きく浮かび上がった。一方、 β サブユニットの欠損解析により、このサブユニットの重要な機能、Runt domainとのヘテロ二量体形成には、N末端の135アミノ酸の領域が必要であることを示した。次いでRunt domainの配列から予想されていた酸化還元による活性調節についての検討を行い、 α サブユニットがAP-1、NF- κ Bなどと同様な酸化還元制御を受ける可能性を明らかにした。この結果、 α サブユニットの持つ複雑なDNA結合活性の調節機構を、酸化還元制御と β サブユニットによる制御の両方から説明することができた。

第二章 材料と方法

2.1 実験材料

2.1.1 化学薬品、酵素

化学薬品は、特に明記しない限り、市販の特級試薬を用いた。制限酵素、DNA修飾酵素類(T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase, Klenow fragment etc.)は、東洋紡績(TOYOBO)、宝酒造(TAKARA)、New England Biolabs、Bethesda Research Laboratories、およびBoehringer Mannheimから購入した。

2.1.2 菌株、プラスミド、および培地

本研究に用いた大腸菌はK12株由来のXL1 - Blue、M15p (Rep4)、およびB株由来のBL21 (DE3)であり、以下にこれらの遺伝子型を示した。主としてプラスミド構築にはXL1 - Blueを、蛋白質過剰生産における宿主としてはM15 (pRep4)、BL21 (DE3)を利用した。プラスミドpRep4はpACYC由来であり、カナマイシン耐性の表現型(Km^r)を示す。他のプラスミドはすべてpBR322由来であり、アンピシリン耐性の表現型(Amp^r)を持つ。大腸菌のための培地はLB培地、およびTerrific Brothを用い37℃にて培養した。

菌株

遺伝子型

- XL1-Blue : endA1, hsdR17(r_k^- , r_k^+), supE44, thi-1, λ^- , recA1, gyrA96, rel A1, Δ (lac),
[F',proAB, lacI^qZ Δ M15, Tn10(Tet^r)]
M15 : Nal^s, Str^s, rif^s, lac⁻, ara⁻, gal⁻, mtl⁻, F⁻, recA⁺, uvr⁺
BL21(DE3) : F⁻, ompT, hsdS_b(r_b^- , m_b^-), dcm, gal(DE3)

2.2 実験方法

2.2.1 DNA操作

一般的な大腸菌、DNA操作は、Sambrookら、またはAusubelらの方法に従った[Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 1994]。

2.2.2 DNA電気泳動

アガロースゲル、DNAシーケンス用のポリアクリルアミドゲル電気泳動は、基本的にSambrookら、またはAusubelらの方法に従った[Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 1994]。アガロースゲル電気泳動は、0.6 - 1.5 %アガロースを用い、泳動用バッファーとして0.5 μ g/ml臭化エチジウムを含むTAEバッファー(40 mM Tris base, 20 mM acetate, 2 mM EDTA, pH8.1)を用いた。DNAシーケンスは、アクリルアミドとしてAT biochem社のLong Rangerを5 %の濃度にして用い、泳動用バッファーには0.6 x TBEバッファー(54 mM Tris-borate, 1.2 mM EDTA, pH 8.0)を用いた。

2.2.3 オリゴヌクレオチドプローブの合成

合成オリゴヌクレオチドは、Milligen Biosearch Cyclone Plusを用いてシアノエチルアミダイト法により合成しHPLC精製したもの、およびサワディーテクノロジー社に委託合成したものを使用した。

2.2.4 cDNAライブラリー、およびプローブの調製

cDNAライブラリーは、*Ha-ras*によってトランスフォームされたNIH3T3細胞から抽出したmRNAをもとに、プラスミドpSI4001 [Shigesada et al., 1987]を使ったベクタープライマー法[Zu et al., 1990]によって作成した[Ogawa et al., 1993a, Ogawa et al., 1993b]。

スクリーニング用のメンブレンフィルターの調製は、基本的にSambrookら、またはAusubelらの方法に従ったが[Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 1994]、大腸菌のまき方、

DNAのメンブレンへの固定法に関しては次のように改変した。cDNAプラスミドライブラリーを持つ大腸菌は、直径8cmのナイロン膜(Pall社, Biotex)一枚につき約2万コロニーになるようにまいたが、この時ナイロン膜をブフナー漏斗で軽く吸引しながら、大腸菌懸濁液を直接、パスツールピペットで滴下することによって行った[Ausubel et al., 1994]。DNAの固定は、ナイロン膜を固定溶液(0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate, 5 % SDS, pH 7.2)で湿らせ、電子レンジで150秒加熱することによって行った[Buluwela et al., 1989]。

プローブは精製PEBP2のペプチド配列から推定された縮退オリゴヌクレオチド(詳細については後述)を用い、3'末端をT4 polynucleotide kinaseと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて標識した。

2.2.5 cDNAスクリーニング

操作は基本的には、Ausubelらの方法に従ったが[Ausubel et al., 1994]、ハイブリダイゼーション、洗浄において、塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC)溶液を用いた。この溶液を用いると、DNAの融解温度(T_m)がプローブの長さにも依存し、その塩基組成(GC含量)の差に影響されないため、縮退オリゴヌクレオチドを用いるスクリーニングを行う場合に非常に有効である。なおこの場合、融解温度 T_m は次の式で表わされる。

$$T_m = -682 \times L^{-1} + 97 \quad (L: \text{プローブの長さ, } 15 \text{ bp} < L < 33 \text{ bp})$$

実際の手順は、ハイブリダイゼーション溶液(3 M TMAC, 10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 0.5 % SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ salmon sperm DNA, 0.1 % skim milk, pH 6.8)にラベルしたプローブを最終濃度で32 ng/ml (2×10^6 cpm/ml)になるように加え、48℃で72時間のハイブリダイゼーションを行なった。続いて洗浄溶液(3 M TMAC, 50 mM TrisCl, 0.2 % SDS, pH 8.0)で50℃にて1時間洗浄し、最後にSSC溶液(0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate, 0.1 % SDS, pH 7.2)で室温にて1時間洗浄した。

2.2.6 cDNA塩基配列決定

分離した α サブユニットのcDNAクローンは、これを持つpSI4001由来のプラスミドから切り出し、プラスミドBlue Script II SK+, KS+ (Stratagene)にサブクローンしなおした。

続いてTAKARAのデリレーションキットを用いExoIII / Mung Bean Nucleaseによる一方向欠損変異プラスミドの作成を行い、Blue Script II Protocols (Toyobo発行)に従ってM13ヘルパーファージを用いた一本鎖DNAの調製を行った。塩基配列の決定は、センス鎖、アンチセンス鎖の両方についてUnited States Biochemical社のSequenase Version 2.0 Step-by-Step Protocols (Toyobo発行)に従い、ダイデオキシ法[Sanger et al., 1977]を用いて行った。

2.2.7 蛋白質増産のためのプラスミドの構築

α 、 β サブユニットは精製を簡便にするためにヒスチジンタグをN末端に融合させた形で発現プラスミドを構築した。これによって増産された各サブユニットは、ニッケルアフィニティーカラムを通すことによって、ほぼ1ステップで高度な精製が可能になる(詳細は後述)。

まず α サブユニット発現プラスミドの構築について述べる。 α A1、 α A2サブユニットcDNA質の翻訳開始点に、PCRを利用したBamHIサイトの導入を行い[Innis et al., 1990]、このサイトと翻訳領域の外側にあるHindIII、およびNcoIサイトでこれらcDNAの翻訳領域を発現プラスミドベクターpQE9、10、および11(QIAGEN)に組み込み、発現プラスミドpQE- α A1、pQE- α A2を構築した。以下の欠損 α サブユニットの構築を、pQE- α A2をもとにN末端欠損サブユニットはBamHIと、C末端欠損サブユニットはHindIIIと、 α A2をコードする領域の中の適切な制限酵素サイトとの間を切除することによって行った。各欠損サブユニットを表わす名称の、"N"の後の数字はその欠損サブユニットがN末端側の何番目のアミノ酸から存在しているかを示し、"C"の後の数字はC末端の何番目のアミノ酸まで存在しているかを示す。pQEベクターは一部の α サブユニット(α A1, α A2, α N94, α N113)の発現のレベルがあまり高くなかったため、これらはこのベクターから各サブユニットを含むEcoRI - HindIIIの断片を切り出し、高い強制発現能を持つT7プロモーターによる発現ベクターpET3aのXbaIサイトに組み込んだ。

一方、 β 1、 β 2、 β 3サブユニットの各cDNA発現プラスミドは α サブユニットと同様に翻訳領域をその両側のサイトBamHI、SalIで切り出しpQE9ベクターに挿入して構築し

た。C末端欠損サブユニットは β 1サブユニットをもとにSalIサイトと翻訳領域中にある適当な制限酵素サイトを切り出すことによって構築した。 β サブユニットのN末端からの欠損変異体は大腸菌に対して毒性を持つらしく、そのままでは蛋白の増産ができなかったため、 β 1、 β 2サブユニットを適当な制限酵素サイトで切り出し、pQE13、およびpQE16ベクターに組み込みN末端側、あるいはC末端側にジヒドロ葉酸還元酵素、(DHFR)を融合した形の発現プラスミドを構築した。これをもとに、適切な制限酵素サイトを用いてN末端からの欠損変異体をDHFR融合 β サブユニットの形で得ることができた。各欠損サブユニット名称は α の場合と同様に存在するアミノ酸残基の番号を示し、" β "の前、または後にある"DHFR"はそれぞれDHFRが β のN末端側、C末端側のどちらに融合したのかを示す。

2.2.8 蛋白質の増産

各種蛋白質遺伝子プラスミドを保持する大腸菌株を50 μ g/ml アンピシリンを含む200 mlのTerrific Brothに植菌し、37 $^{\circ}$ CにてKlett OD = 100 程度まで培養した。この時点で培地に終濃度0.5 mMとなるようにIPTGを加え、さらに37 $^{\circ}$ Cにて6時間振盪培養し発現を誘導した。この後、培地にアジ化ナトリウムを最終濃度10 mMになるように加え、遠心集菌し以下の実験に用いた。

2.2.9 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)は、Ausubel et al., [94]に従った。ビスアクリルアミド0.8%、アクリルアミド30%を含むストック溶液を作っておき、必要に応じて様々なゲル濃度のスタッキングゲルやセパレーティングゲルを調製した。スタッキングゲルの組成は、4 % アクリルアミド, 125 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, pH6.8、セパレーティングゲルの組成は、10 -15% アクリルアミド, 375 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, pH 8.8であり、また泳動バッファーとして、SDS-loading buffer (3.1 g/l Tris base, 14.4 g/l glycine, 0.1 % SDS)を用いた。

蛋白質の増産の確認は、次のような手順で行なった。1 mlの培養液を遠心し、沈殿した菌体に、KlettOD数と等しい μ l数のSDSサンプルバッファ(1.25 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 20 % glycerol, 250 mM β -mercaptoethanol (β -ME), 0.01 % bromophenol blue (BPB), pH 8.0)を加え良く懸濁する。これを沸騰水中で3分間加熱し、サンプルを5 μ lずつゲルにのせ泳動する。泳動後、クマシーブルー染色液(0.5 % Coomassie Brilliant Blue R, 50 %エタノール, 10 %酢酸)中にゲルを浸し、室温で約30分振盪した。その後、脱色液(45 %エタノール, 10 %酢酸)に浸し、蛋白質のバンドの部分と背景のコントラストが十分つくまで数回液を取り替え振盪し、最後に7 %酢酸につけ、バックグラウンドを完全に除いた。ゲルは3 MM濾紙上に移して乾燥させるか、もしくはゲルドライ溶液(Iwaki)につけ、セロファンフィルムにはさんで乾燥させて保存した。

2.2.10 蛋白質の精製

遠心して集めた菌体を5 mlのバッファA (6 M guanidine-HCl (GuHCl), 0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris, 10 mM β -ME, pH 8.0)によく懸濁し、プロテアーゼ阻害剤 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を最終濃度1 mMになるように加え、1時間室温でよく攪拌する。懸濁液を30分遠心し十分に菌体を沈殿させてから、増産蛋白を含む上澄みを別の容器に移し、遠心による沈殿では除くことのできなかったDNAを断片化してしまうために超音波破碎処理を行う。これを0.5 mlのニッケル-ニトリロ三酢酸レジン (Ni-NTA)カラムにのせ、8 mMイミダゾールを含むバッファA (5 ml)で洗浄する。以下、目的蛋白を最終濃度12 mM, 16 mM, 40 mM, 80 mM, 250 mMイミダゾールを含むバッファE (20 % glycerol, 6 M GuHCl, 0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris, 10 mM β -ME, pH 8.0)を1.5 mlずつ用いて段階的に溶出する。この中から最も適切な溶出サンプルを選び、一部取って100倍容のバッファD (0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris, 10 mM dithiothreitol (DTT), 30 % glycerol, pH 8.0)に対して4℃で8時間以上透析し、再活性化する。

一部の α 、 β サブユニット(α A1, α A2, α N94, α N113, および β 1, β 2, β 3, DHFR- β 1)は、このNi-NTAレジンによる精製だけでは、これらサブユニットの分解産物を完全に

は除くことが出来なかったので、さらに以下に述べる方法でさらに高度に精製した。まず、これらを含む溶液を5%三塩化酢酸(TCA)で沈殿し、SDSサンプルバッファーに溶かし加熱処理後、SDS-PAGEによって蛋白質の展開を行った。泳動後、0.3Mの塩化銅でゲルを染色し、目的蛋白を含むゲル断片を切り出した。引き続きゲル断片の脱染を0.25 M EDTAを用いて行い、エレクトロエリユージョン装置(ISCO)を用いて目的蛋白を濃縮溶液の形で回収する。さらに、この溶液より精製蛋白を10% TCAで沈殿し、一度バッファーEに溶かし前述の方法を用いて透析、再塩活性化した。

2.2.11 ゲルシフト解析(EMSA)用プローブ

ゲルシフト解析用のプローブ、またはコンペティターとして、以下に示す配列を持つオリゴDNA相補鎖対を合成し二重鎖にアニールさせて用いた。その配列は以下のとおりである。なお、囲んだ部分がPEBP2結合配列を、またアスタリスクは変異塩基を示す。

野生型PEBP2配列

```

5'   CATGGTAACTGACCGCAGAGGGC   3'
3'   CATTGACTGGCGTCTCCCGGTAC   5'

```

変異型PEBP2配列

```

          *   *
5'   CATGGTAACTCACGGCAGAGGGC   3'
3'   CATTGAGTGCCGTCTCCCGGTAC   5'

```

プローブの配列は、ポリオーマウイルスDNAのエンハンサーAコア領域(5119-5137)の19塩基の配列をもとにして、その両側に4塩基の突出を持たせた形のものをを用いた。なお、この領域付近には他の核内因子、PEBP4、AP-1、Etsなどが結合することがわかっており、これらの影響をできるだけ排除するために、PEBP2結合配列の外側に数個の点変異を導入した。標識はアニールさせたプローブに、dGTP、dCTP、TTP、[α - 32 P]dATPを加えて、Klenow fragmentで両方の1本鎖部分を埋める形で行った。コンペティ

ターDNAとして用いる場合は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ の代わりに、非標識dATPを加えて同様に修復反応を行ない、完全な二本鎖の形にした。標識されたプローブは、100 mM KClを含むTEバッファーで平衡化したSephadex G-50カラムにかけ、反応しなかった $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ と分離した。

2.2.12 ゲルシフト解析(EMSA)

標準的ゲルシフト解析(EMSA)のDNA結合反応は、総結合反応溶液10 - 20 μl 中に、精製蛋白質 0.2 - 100 ng、DNAプローブ 10 fmolに、EMSAバッファー(20 mM HEPES-KOH, 4 % Ficoll, 2 mM EDTA, 100 mM KCl, pH 7.6)、1 mM DTT、200 $\mu\text{g/ml}$ BSA、0.1 μg poly d(I-C)、6 % glycerol、0.04 % BPBを加えた条件でおこなった[Kamachi et al., 1990, Topol et al., 1985]。以下、特別に明記しない限りEMSAはこの条件で行った。また、結合の特異性を見るためのコンペティション実験は、これに100倍モル当量の競合DNAを加えることによって行った。反応は25 $^{\circ}\text{C}$ で30分行ない、続いて0.25 x TBE (22.5 mM Tris-borate, 0.5 mM EDTA, pH 8.0)を含む6 - 15 %ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド、39:1)に反応液2 - 6 μl をのせ、泳動バッファーとして0.25 x TBEを用いて4 $^{\circ}\text{C}$ 、あるいは室温で電気泳動を行った。泳動終了後ゲルを乾燥し、各バンドをイメージングプレートに露光し、バイオイメージングアナライザBAS2000システム(富士フイルム)によって解析、あるいはX線フィルムに露光し現像することによって検出した。

2.2.13 タンパク-タンパク親和性カラム解析(ACA)

DNA結合能を失った α サブユニットのヘテロ二量体形成能領域を解析するために、タンパク-タンパク親和性カラム解析(ACA)を行った。1 μg のヒスチジンタグが融合した α サブユニットと、ヒスチジンタグのない β サブユニットとをACAバッファー(0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris, 1 mM β -ME, 20 % glycerol, pH 8.0)中において、4 $^{\circ}\text{C}$ で30分間の結合反応を行なった。続いて反応液をNi-NTAカラムにのせ、それぞれ40 mM、250 mMのイミダゾールを含むACA洗浄、溶出バッファーで α 、 β サブユニットを溶出した。

このようにして得られた分画はSDS-PAGEによって展開し、銀染色キット(和研薬工業)によって銀染色し解析した。

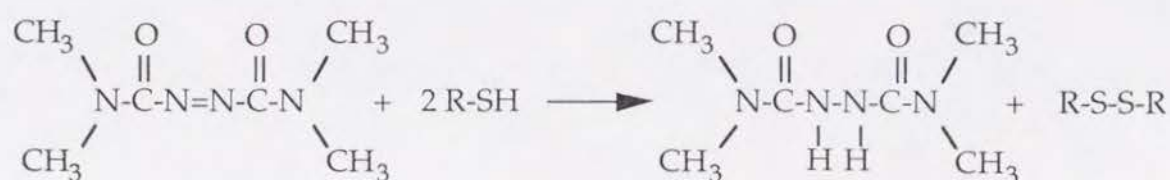
2.2.14 蛋白質-DNAの解離速度の測定

α N94C226(以下、RDとする) 1 ngに、 β 2サブユニット 20 ngを加え、または加えずにEMSA反応液中で標識プローブと25℃で30分間の結合反応を行った。反応液を4℃の恒温槽中でインキュベートし、ここに50倍等量の非標識プローブを添加し反応を続け、0分から80分まで経時的に、EMSAゲルにのせ4℃の恒温泳動を行った。この結果、蛋白質-DNA複合体によって形成されるシフトバンドがどの位の時間経過で消失するかを観察した。

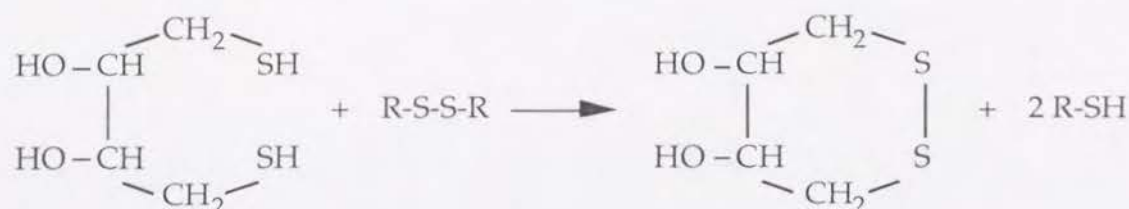
2.2.15 Runt domainのSH基の酸化、還元

Runt domainの酸化、還元処理は、前述の標準的EMSA反応液とほぼ同じ組成の溶液を用いて行った。具体的には、RD 1 - 10 ngに、プローブDNA 10 fmol、EMSAバッファー(20 mM HEPES-KOH, 4 % Ficoll, 2 mM EDTA, 100 mM KCl, pH 7.6)、0.1 μ g poly d(I-C)、6 % glycerol、0.04 % BPBを加え、これに適当濃度のジアミド、もしくはDTTを加え、25℃で10分間反応を行った。酸化反応、還元反応を組み合わせで行う場合も同様にして、それぞれの反応を25℃で10分ずつ順次行った。これらの反応後、反応液の一部を取り、EMSAゲルにのせ泳動を行う。各バンドの強度は前述のイメージングアナライザによって測定した。なおジアミド、DTTによる酸化、還元反応を示す化学式は以下の通りである。

ジアミドによる酸化反応：

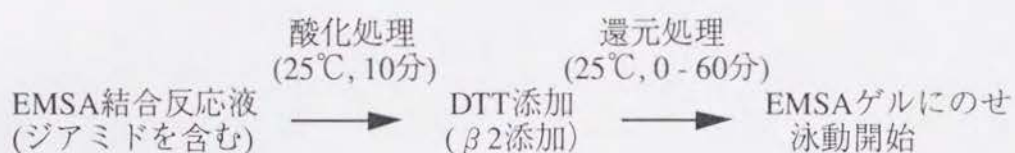


DTTによる還元反応：



2.2.16 酸化、還元環境下におけるRunt domainの活性の変化

酸化的、還元的環境とRunt domainの活性との関係を明らかにするため、以下に述べるような反応を行った後、EMSAを用いて基礎的解析を行った。(1) RDの失活に必要なジアミド濃度の決定：上記の組成に加え、0 - 25 mMのジアミドを添加し、25℃で10分の反応を行った。(2) 至適DTT濃度の決定：無処理(精製、透析したサンプル) RD、および2.5 mMジアミドによって酸化失活処理(上記参照)したRDに、0 - 300 mMのDTTを加え、25℃で10分の反応を行った。(3) 至適還元反応時間の決定：(2)同様に、無処理、酸化処理したRDの両方で解析を行った。反応は最終濃度100 mMになるようにDTTを添加することにより開始し、0 - 60分後に反応液をサンプリングして、これをEMSAによって解析した。このとき、DTTを全く加えないで反応させたものをコントロールとした。実験の実際の手順については下図参照。



2.2.17 Runt domain-βサブユニットヘテロ二量体に対する酸化、還元の影響

Runt domainとβサブユニットからなるヘテロ二量体に対する酸化、還元条件の影響を観察するために、RDに対して、βサブユニット(β2, β3)を先に、あるいは酸化剤、還元剤を先に添加することによって、ヘテロ二量体のDNA結合活性にどのような変化が起こるかを測定した。このときの酸化、還元、および結合反応は前述(2.2.14)の通りに行った(図3.3.1C参照)。

2.2.18 DNA結合活性における酸化還元の影響の定量的解析

Runt domainのDNA結合活性における酸化、還元の影響を解析するために、RDをまず酸化処理して一度完全に失活させ、続いて2種類の還元条件において再活性化し、定量的EMSAによってそのDNA結合活性を解析した。

実際の手順は、以下の通り。まず10 ngのRDに2.5 mMのジアミドを加え、25℃10分間の反応によって酸化する。続いて最終濃度10 mM、300 mMとなるようにDTTを加え、25℃で10分間の反応を行う。このとき同時にEMSAプローブを最終濃度1 - 32 fmol / μ lとなるように加え、また β 2サブユニットあるいは再蒸留水を加えて、結合反応も同時に進行するようにした。

第三章 実験結果

3.1 PEBP2 α AサブユニットcDNAクローンのスクリーニングと塩基配列決定

3.1.1 α サブユニットcDNAのスクリーニング

Kamachiらは*Ha-ras*でトランスフォームされたNIH3T3細胞からPEBP2を精製し、それが30 - 35kDa、および20 - 25kDaの大きさを持つポリペプチド鎖からなることを示した[Kamachi et al., 1990]。またこれら二つのグループは、銀染色の色調が相違することから、それぞれ性質の異なるポリペプチドの集まりであることが予想され、30 - 35kDaのポリペプチドを α 、20 - 25kDaのポリペプチドを β と名付けた。続いて約10 μ gの精製PEBP2を用いて、 α 、 β ポリペプチドを混合した状態での部分アミノ酸配列の決定を行ない、図3.1.1に示した#1から#5までの5つのアミノ酸配列を得た。#1のアミノ酸配列をもとに

α サブユニット

#2 [K] N Q V A R F N (X) L R F V G R S
#3 [K] V T V D G P (R) E P (R) (R) H H Q K
AARGTNACNGTNGAYGG F3 probe 17mer (256x)

β サブユニット

#1 [K] F E N E E F F R K
AARTTYGARAAYGARGARTT F1 probe 20mer (64x)
#4 [K] V Y L K
#5 [K] L S R E S (E) I K

図3.1.1 PEBP2の部分アミノ酸配列、およびこれをもとにして合成した縮退オリゴヌクレオチドプローブ

アミノ酸はすべて一文字記号で示す。Xは不明なアミノ酸、括弧中のアミノ酸はいまいなアミノ酸を表わす。各ペプチドはLysine-Cエンドペプチダーゼによって切断したものであるため、先頭にリジン残基[K]を補ってある。下線部はオリゴヌクレオチドプローブ合成のもとにしたアミノ酸配列、その下はスクリーニングのプローブとして用いた縮退オリゴヌクレオチド配列を表わす。

したプローブを用いてcDNAライブラリーをスクリーニングし、 β サブユニットのcDNAクローンを分離した。これらのcDNAは#1、#4、#5のアミノ酸配列を同時に含むORFを持つことが判明した[Ogawa et al., 1993b]。しかし、#2、#3のアミノ酸配列は β サブユニットのクローンの配列中には見当たらないため、別のmRNAによってコードされていると考えられた。そこで本研究では#3のアミノ酸配列をもとに、F3プローブ(256縮退を持つ17merのオリゴヌクレオチド、図3.1.1)を合成し、これを用いてcDNAライブラリーのスクリーニングを行なった。

3.1.2 α サブユニットcDNAライブラリーのクローニング

cDNAライブラリーはHa-rasで形質転換されたNIH3T3細胞のmRNAを用いて調製された[Ogawa et al., 1993b]。一枚のフィルターに約2万個のコロニーが出るように大腸菌をまき、3'末端をラベルしたF3プローブを用いて一回に10枚スクリーニングした。一次スクリーニングによって、1個の強いシグナルを示すコロニーと、4個の弱いシグナルを示すコロニーが検出された。二次スクリーニングの結果、シグナルははじめの1個のクローンだけに確認された。こうして得たプラスミドをpHK1と、またこの挿入cDNAをPEBP2 α A2クローンと名付け、さらに実験を進めた。

3.1.3 PEBP2 α A2クローンの塩基配列決定

pHK1はその長さから約2.2 kbの挿入配列を持つことがわかった。挿入cDNAはpBSII SK+、およびKS+にサブクローン後、一本鎖DNA化し、センス鎖、アンチセンス鎖の両方についてシーケンスを決定した。分離されたcDNAクローンは、数百塩基対にわたり非常にGCに富む配列を含んでいたため、シーケンスゲルの読み取りが困難であったが、伸長反応をdITPとピロリン酸分解酵素の存在下に行なう方法を採用することによって、この問題を解決することができた。

3.1.4 PEBP2 α Aファミリーのクローニング

我々は引き続きF3プローブを用いて同cDNAライブラリーのスクリーニングを大規模に行い、さらに長さの異なる2種類のcDNAクローン α A1、 α A3を分離した。これによって α A1(513アミノ酸、55.8kDa)、 α A2(30アミノ酸、33.7kDa)、 α A3(449アミノ酸、48.6kDa)の合計3種類の α AサブユニットのcDNAクローンを得た(数字は推定アミノ酸数、および分子量)。これらのクローンは3'領域以外は全く同一の塩基配列を共有しており、同一遺伝子の転写産物のディファレンシャルスプライシングによって生じたものと考えられる。

これら3種類の α Aサブユニットのうち、最も長い翻訳領域を持つ α A1クローンを基準にして以下の解析を行うことにした。 α A1クローンは、 α A2クローンにある翻訳開始領域および5'非翻訳領域を欠くが、 α A2クローンの16番目のアミノ酸から304アミノ酸の領域を共有し、さらにC末端に α A2クローンには存在しない翻訳領域を持ち、また4kbpにもおよぶ長い3'非翻訳領域を持つ。そこで α A1クローンに、このクローンに欠けている α A2クローンの5'末端領域を継ぎ合わせて、これを全長 α A1クローンとして用いた。

3.1.5 α サブユニットcDNAの塩基配列上の特徴

α A1クローンは全長6518塩基対からなり、この中のnt 1643-1659(二重下線部)が用いたプローブに完全に一致する。さらに、nt 1016のATGに始まって、nt 2555のTGAに終わる長いコーディングフレームが存在し、このフレーム内に#2、および#3のアミノ酸配列が両方ともに含まれていた。以上のことから、 α A1が、目指す第二のサブユニットに対応するクローンに間違いのないことが確認された。翻訳開始点として示したATG領域の配列(GTGATGC)は、真核生物の転写開始コンセンサス(RNNATGG)と大きくはずれておらず、またin vitro翻訳系によって蛋白質の合成を行うと、ほぼアミノ酸配列から推定される大きさの産物が得られる。さらにこのATGの18塩基対上流に、同じフレームで終止コドンが現われる(下線部)。

α A1クローンの3'末端にはポリA配列が、またポリA付加シグナル配列(AATAAAA)が4つ存在しており、このcDNAは本来のmRNAの3'末端から正しく逆転写されてできたと判断できる。さらにこの領域にはmRNA不安定化シグナル配列(ATTTA)が9つ散在し、 α A1 mRNAはターンオーバーが非常に短い種類のmRNAであることが示唆される[Brawerman 1989]。 α A1クローンには、約1 kbにもなる長い5'非翻訳領域、および約4kbの非常に長い3'非翻訳領域が存在している。mRNAにある長い非翻訳領域は、何らかの調節機構に関与しているものと考えられており、実際、発生調節やmRNAの安定性に大きく影響を与える例が知られている。また、このクローンは全体として高いGCの含量を持ち、特に5'非翻訳領域と考えられる部分で顕著であることが注目される。このような配列は高次構造を取りやすいと予測され、転写、あるいは翻訳の効率に影響与えている可能性が十分考えられる。さらに3'非翻訳領域中に存在する(CTT)を最小単位とするトリプレットリピートは、最近遺伝子調節において、特に遺伝病との兼ね合いで注目されている。このことについては考察で詳しく述べる。

```

1 CTGAAGTTAACAACGAAAAATTAACGCCAGTCGGAGCAGCCTGAGGCTCTCCCGCTTCTC
61 AGCTTTAGCGTCGTCAGACCGAGAAGTGGTTCCCGGTCTTGAGGGTGAAGTGGGGAGCCG
121 AGGACGCAGGCGGCGATGTCCTAGGCGGGACCTCCTCCCTACAGCTTCGGGCGCCGAGC
181 GAGCGCAGCGGCGCTTCTAGCGGCCGCGGGCGGCGGCAGCGGCTGCGATCCGAGGCTC
241 CAGATCTGTCGCCCCGAGATCCGCTCTCCCCCGCCCCCACTTACCTCCCGGCACCTTGA
301 AACCGCAGGGGGGGCCCGGGGCACTTTGCAAAGAGCAGGAGGGACGAGGCTGCGAGCTAGA
361 CGGCGGCGAAGGAGAGGGCGAGAGGAGAAGCCGGGGAAAGGAAGGACTCGGCGGCCGAG
421 GACTCGGAGCGCGCTGCCGCGCGGGGAGCGCGCAGCGGCCTCGGAGGAGGAGGCGGAGG
481 AGGCGGCGCGGGCAAGCGACGGCGCCGCGAGCTGGGCAGCCGCGCTCTGCTTGGCGGTGG
541 CGGACAGCGAGGAGCCACACGCACCCGCCGAGATGGACTGCTGAACCTGCGGGGTCCACT
601 ACCGTACTGGAACCCGAGCGGGGCGCCAGCGCACCCAGGACACGGTGCCCCAAGGGGCC
661 CCTACTGCAAGCTGTTAACTTCAAGTCCCTTGCGGCGGCTGGGCCAAACACGCCCCGCG
721 TCCCGCTCGTAGCAGCCACCGCCAGGGACTCCCAAGCCTCCCGGTGGAGATCCGCGCCTC
781 TCGGGTGTCCCCACCCGCTACCCGACTCTGTCCGGTCTCCAGTCGCGGGCCCCCAGCA
841 GACTCCGCCCCGACACGGCTTCCTCGAACTTGATTTCTCACCTCCTCTGTCCCGTCACC
901 TCCATCCTCTTTCCGCCCCGCTCGCCTCCACCCCTCGATTTCTCCTCCTCGCCCCC
961 CATTTCCACCCTCCTCCCCCTCCCCCGGCCACTTCGCTAACTTGTGGCTGTTGTGATGCG
                                     M R 2
1021 TATTCTGTAGATCCGAGCACCAGCCGGCGCTTCAGCCCCCCTCCAGCAGCCTGCAGCC
      I P V D P S T S R R F S P P S S S L Q P 22
1081 CGGCAAGATGAGCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCA
      G K M S D V S P V V A A Q Q Q Q Q Q Q Q 42

```

1141	GCAACAGCAGCAGCAACAACAGCAACAGCAACAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	
	Q Q	62
1201	GGAGGCGGGCCGCAGCAGCAGCGGGCGGCAGCGGGCGGCAGCAGCGGGCGGGCGGCCAGT	
	E A V	82
1261	GCCCCGATTTGAGGCGCGCCGCACGACAACCGCACCATTGGTGGAGATCATCGCGGACCACCC	
	P R L R P P H D N R T M V E I I A D H P	102
1321	GGCCGAACCTGGTCCGCACCGACAGTCCCAACTTCTGTGCTCCGTGCTGCCCTCGCACTG	
	A E L V R T D S P N F L C S V L P S H W	122
1381	GCGGTGCAACAAGACCCTGCCCCGIGGUUTTCAAGGTTGTAGCCCTCGGAGAGGTACCAGA	
	R C N K T L P V A F K V V A L G E V P D	142
1441	TGGGACTGTGGTTACCGTCATGGCCGGGAATGATGAGAACTACTCCGCCGAGCTCCGAAA	
	G T V V T V M A G N D E N Y S A E L R N	162
1501	TGCCTCCGCTGTTATGAAAAACCAAGTAGCCAGGTTTCAACGATCTGAGATTTGTGGGCGG	
	A S A V M K N Q V A R F N D L R F V G R	182
1561	GAGCGGACGAGGCAAGAGTTTACCTTGACCATAACAGTCTTACAAATCCTCCCCAAGT	
	S G R G K S F T L T I T V F T N P P Q V	202
1621	GGCCACTTACCACAGAGCTATTAAAGTGACAGTGGACGGTCCCCGGGAACCAAGAAGGCA	
	A T Y H R A I K V T V D G P R E P R R H	222
1681	CAGACAGAAGCTTGATGACTCTAAACCTAGTTTGTCTCTGATCGCCTCAGTGATTTAGG	
	R Q K L D D S K P S L F S D R L S D L G	242
1741	GCGCATTCCTCATCCAGTATGAGAGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTCCCT	
	R I P H P S M R V G V P P Q N P R P S L	262
1801	GAACTCTGCACCAAGTCCTTTTAATCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAGATCCCAGGCA	
	N S A P S P F N P Q G Q S Q I T D P R Q	282
1861	GGCACAGTCTTCCCCACCGTGGTCCATGACCAGTCTTACCCCTCCTATCTGAGCCAGAT	
	A Q S S P P W S Y D Q S Y P S Y L S Q M	302
1921	GACATCCCCATCCATCCACTCCACCACGCCGCTGTCTTCCACACGGGGCACCGGGCTACC	
	T S P S I H S T T P L S S T R G T G L P	322
1981	TGCCATCACTGACGTGCCAGGCGTATTTTCAGATGATGACACTGCCACCTCTGACTTCTG	
	A I T D V P R R I S D D D T A T S D F C	342
2041	CCTCTGGCCTTCCTCTCTCAGTAAGAAGAGCCAGGCAGGTGCTTCAGAACTGGGCCCTTT	
	L W P S S L S K K S Q A G A S E L G P F	362
2101	TTCAGACCCAGGCAGTTCCTCAAGCATTTCATCCCTCACTGAGAGCGCTTCTCCAACCC	
	S D P R Q F P S I S S L T E S R F S N P	382
2161	ACGAATGCACTACCCAGCCACCTTTACCTACACCCCGCCAGTCACGTCAGGCATGTCCCT	
	R M H Y P A T F T Y T P P V T S G M S L	402
2221	CGGCATGTCCGCCACCACTCACTACCACACGTACCTGCCACCACCCTACCCCGGCTCTTC	
	G M S A T T H Y H T Y L P P P Y P G S S	422
2281	CCAAAGCCAGAGTGGACCCCTTCCAGACCAGCAGCACTCCATATCTCTACTATGGTACTTC	
	Q S Q S G P F Q T S S T P Y L Y Y G T S	442
2341	GTCAGCATCCTATCAGTTCCCAATGGTACCCGGGGGAGACCGGTCTCCTTCCAGGATGGT	
	S A S Y Q F P M V P G G D R S P S R M V	462
2401	CCCACCATGCACCACCACCTCGAATGGCAGCAGCTATTAAATCCAAATTTGCCTAACCA	
	P P C T T T S N G S T L L N P N L P N Q	482
2461	GAATGATGGTGTGACGCTGACGGAAGCCACAGCAGTTCCCAACTGTTTTGAATTCTAG	
	N D G V D A D G S H S S S P T V L N S S	502

2521 CCGCAGAATGGATGAGTCTGTTTTGGCGGCCATATTGAAATTCGTCAACCATGGCCCAGTG
 G R M D E S V W R P Y *
 2581 GCATGGGGGCCACATCCCGCATGTGTTAATATATACATATATAAAGAGAGTGCCTATATA
 2641 TGTATATTGATTAGCTAACTAGAAGATTTCTCATTC AATCCCTAGTCATGATCTTTGCAAC
 2701 CCTAAGAGGGTGGGGGCAGTCATAACTGGGTTTCATATTGTTTACTATTTAAGATGTCCC
 2761 CTTTACCAAGGAACAAACCGTCAAAGGTGTTGTCTGGTCTGTTTTTCATAAGTGACCTGTT
 2821 CCCACGCCGGTTCAGAGAGGTGGACTCTGGGTCTGGGAGGAAGGAGAGACACTTCCTCTC
 2881 TGTGCTTTGAAACCACAGCCTCTGCTGTGTGGCAGCCGGTACACTCTGCAGACCCGCTTA
 2941 CAGAGTCAGATGTGGTGCACTCAGAAAGGGACAAGAGGCAGAGTGGCTGCTTCTGTCCGC
 3001 TGCCGTCCACTCTGCCGTCCACCTGTTCCAAAGTTTTTCCTTCAGACTTGCTGCAGGTACT
 3061 CATTTGAACTTTTTGAGTTCACTTTTTTTTTTTCCATATTCTAAGAAAGTGACTTCAAAAAT
 3121 ACTGATCAGGACAGATAATTTTATTTTACCTTTTATATTTTCTCACTTCCCCCATTTAAC
 3181 CAAAAAGAAATCCCGTTCCCCCTCCCCCGTTCCCTTCTGCTTCTCCCTTTATGCAAACTGA
 3241 AAATGGCAATGCCTTATTTATTTATAGCCATAATGGTATAGTGTGTGAGTTGGCTGTGTGTT
 3301 ATGTGTTTTTTTTTCTTTTTTTTCTTTTTTTTAAATATATGAATATGTGTAAAATCTGAAGTAA
 3361 CTTGCTAACGTGAATGGTCATATAACTTTTAAAGATATATTTATAATATATTTAATGACATT
 3421 TGGACATTTGGAACATTTCTTAGTGTAATGATATGTTGACTTCGGTCTCTAAAAGTGTGC
 3481 TTCTTCTTCAATACCAAGTTTCTTCAGTGGGCTAGAGCCATATCGGAAATATTGCTAAGC
 3541 AATCTCAATTCCCTCAGGCATAATGTGATTTTTTTTTTTTTTGAAGATAACTCCCATCTCC
 3601 AAATAGTTTAGATGTAGTTTGTTTTTCACGATGTATGAAGGAGATGCTCTGTCTTCTTCTT
 3661 TCAGGCATTTGATTGCCCTCGACACAGCTTTGCTTTTAAAGCAATAATTAGGGATTAAA
 3721 ATAACAAAAACAAAACAAAAGCCACCTATAGCCCTTTAACTTAACGTGGCCCCCTTTAC
 3781 TAGCATGAAATGCTGGAGACATGTGGTTTCCCTAATTTCTCCATTTTGGGGGTGGTGGGAG
 3841 CGGGGAGGGTGGCCATTATGACTCTTATCATATTA AAAAGCCAATGCACAAGTGATTGGT
 3901 TGAAGTGCAGAAAAGTGTCTGTGGTCTCTGAGTTGAGCAAACTCTAAATTGCAGGCTT
 3961 CGTGGTTGAGGGCCTAGTCAGCTGAAAGCCACGCGTGTGGTAAAGGCTCAGGCATGGCTT
 4021 GGAGAACCTAGGAACACATTAGGAGCCTGCACCTACCAGCCTCACCATACAGCCATTACAG
 4081 GGGAAACCAAAAAGTGCCTTACCCAAGGAGGGCCCCCAGCAGCTTTCCAGGAAGTCCAAT
 4141 GAAGTCGCTGTCTCGGGGAAC TGGTCAGCTGAAGTAGCAACCGGTAGCTGATGTCAGTA
 4201 GACAACAGAACC TGTGGGACCTCCAGGAAACCTTTGACATTGGAGGCTTTTATTAGGCA
 4261 GGGCAACAAGAGCAGGGAAGGCCATGTACCCATTGGTATCTGCCATTGTGTGTGAGTTT
 4321 GAGATCCAGCCCTCCTTGGAGGATGTACTGTGATCATTCCTGGTACCTTAGGGCCAATCC
 4381 CTAAGTGTGGCTTCCCTAATCCAGGCCAGGGATCATTCAGTGATACCACCAGGCCAATCCC
 4441 AGCATTCCTCCTGCACAAAGTGTGTGTGTGGGGGATAGATTGGGGTGGGGCCACCTT
 4501 CATTTGAATCCTGAGTCATTCTAAGAGTTCTGCAAGCTTTTGCCTTCAGCACCTTATACC
 4561 CCCTCGCTCTCTGTTCCCTCTCAGGTTGACCTTTGTCCCAATGCGGGACAGTCCAGAGGC
 4621 AGATGGGGACCTATGTGTGCCCTCCAACCTGCGTTTTTCCCTCAGAATTCATCCTGACTCCCT
 4681 CTGACACAGATTGAGGGGGGGGGGGGAAGAAACCAACCCGCACCAAAGCAAAACACTT
 4741 TGCCTTCTAAAGGCTGTGCACCAAGTAGACGCAGATGGTCAGCCACCTTTGTGTTTCCCT
 4801 TAAGATGGAAATTGTAAC TGATGCTATTTATTTGTGTTGTGTGTGGTAGCTTGAAGCACACC
 4861 ACGGTCCATGTGTTTGTCTGATACCTATTTTCAGCAGCATTTACAAAAGCCAGTGTCTGGT
 4921 TACACTTTTCAGTTTTTCATTAATCAACATGAAAAATGTTACCATTTGGTGCCAGCTGCACCC
 4981 TATTTAATTTTTTTAAGGGCACTATATTTGTACATTTTCGTTTTTAAATGTTAAAGGGCTTC
 5041 TTAAAGTTTACAATACAGTTATCAAGGGAATAGAGGGGATGCATTAGTGCCATAATGTTA
 5101 TTCTAGTGGCTGCAGGCAGCAACCCAGAAGCAGTTTTGAAAACAGGTTGTTTCCCTCTGT
 5161 CCTCCCTTATTTGGGAAAAATCAAGTGCCTTCTTTCACCTTTTCAGGCACCTCACGGTGACT
 5221 CCCGTTACTTAGAGCAGTCTGTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

513

3.1.6 アミノ酸配列の特徴

PEBP2 α A1サブユニットの配列中には、ロイシンジッパー、Znフィンガー、ヘリックス-ループ-ヘリックス、ホメオボックスなどの既知のDNA結合、タンパク-タンパク相互作用モチーフなどは含まれていない、したがってこれはまったく新しいタイプの転写制御因子であることが示唆された。アミノ酸配列の特徴として、N末端側のグルタミン28残基、およびアラニン18残基からなる二つのクラスターが目につく。同様のグルタミン残基のクラスターは最初、ショウジョウバエのNotch遺伝子産物で発見されOPA配列と名付けられている[Wharton et al., 1985]。また、アミノ酸配列の相同性検索の結果 α Aサブユニットは、128アミノ酸の領域(a.a.93 - 220)でショウジョウバエの分節化遺伝子runt、ヒト急性骨髄性白血病関連遺伝子AML1と極めて高い相同性を持つことが明らかになった(図3.1.7A, B参照)。我々はこの領域をRunt domainと名付けた。これらについては考察中で詳しく論ずる。

3.1.7 α サブユニットの多様性

我々の研究グループは、さらにその後 α AのRunt domain部分のcDNA配列をプローブとしたクロスハイブリダイゼーションによってマウスB細胞、ヒトのT細胞cDNAライブラリーから、それぞれ α B、 α Cと名付けた別の遺伝子をクローニングした。また、 α Bには α A同様に2種類の差次的スプライシングによるサブタイプ α B1、 α B2が存在している。塩基配列決定によってこれら α B、 α CサブユニットもRunt domainを持つことが明らかになった。特に α BはAML1と全長にわたってほぼ同じアミノ酸配列をもっており、これはAML1のマウスホモログであると考えられる(図3.1.7A, B)。

ノザンプロット解析によりこれら3つの遺伝子はそれぞれ特徴的な組織特異的発現を示すことがわかった。まず α AはT細胞およびNIH3T3で発現している。 α Bは血球系の細胞全般に発現し、 α Cは普遍的な発現を示す。以上、我々のグループによって明らかにされたPEBP2 α サブユニット遺伝子群は、前述のrunt、AML1と共に新しいタイプの蛋白質ファミリーを構成していることが明らかになった。

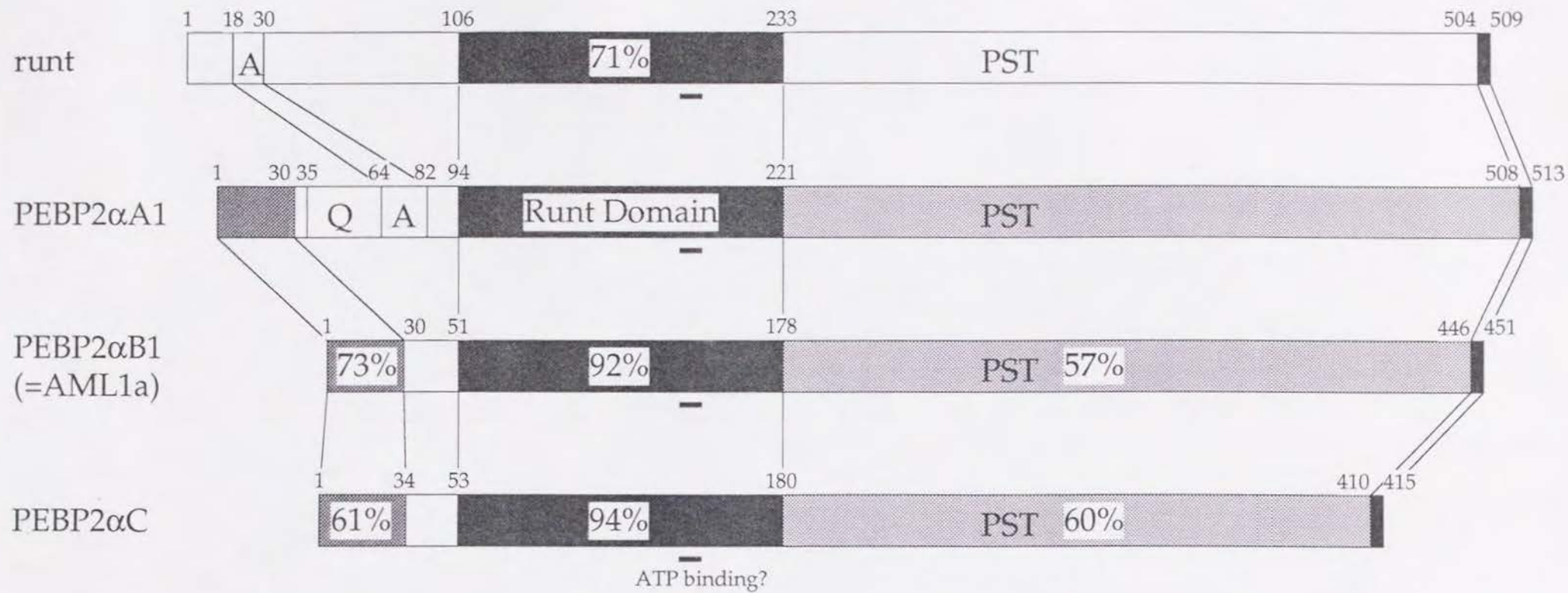


図3.1.7A Runtファミリー蛋白質の構造比較

図中網掛け部はPEBP2 α A1サブユニットとの相同性をもつ領域を示す。特に中央に位置する濃い着色部はRunt domain(本文参照)。また、書き込んであるパーセンテージは、 α A1サブユニットのアミノ酸との同一アミノ酸の含量を示す。

034

```

AML1a 1 MRIPVDASTSRRTTPPSTALSP---GKMSEALPLGAPDAGAALAGKLRS-----GDRSMVEVLADHPGELVRT
alphaA 1 MRIPVDPSTSRRTSPSSSLOP---GKMSDVSFVVAQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAAAAA---AVPRLRPPHDNPTNVEIADHPAELVRT
alphaB 1 MRIPVDASTSRRTTPPSTALSP---GKMSEALPLGAPDGGPALASKLRS-----GDRSMVEVLADHPGELVRT
alphaC 1 MRIPVDPSTSRRTTPSPAFCGGGGGKMGENSEGALSAAVAGPGGRARP-----EVRSMVDVLADHAGELVRT
runt 1 MHLPAGETMVANNTQVLAIAAAAAAAAAAAVAQGPQPOSSNATTASAIINPAQSLANTSTHSASSTGSSTPDLSTNNTSSSSNATTSPQNSAKMPSSMTNMFASLHETLOOYHGELAQE

AML1a 66 DSPNPLCSVLPTHWRCKNTLPIAFKVVALGDVDPDGLTVTMAGNDENYSAELRNATAAMKNQVARFNDLRFVGRSGRGKSFTLTITVFTNPPQVATYHRAIKITVDGPREPRRHQKLLD
alphaA 109 DSPNPLCSVLPTHWRCKNTLPIAFKVVALGEVDPDGLTVTMAGNDENYSAELRNATAAMKNQVARFNDLRFVGRSGRGKSFTLTITVFTNPPQVATYHRAIKITVDGPREPRRHQKLLD
alphaB 66 DSPNPLCSVLPTHWRCKNTLPIAFKVVALGDVDPDGLTVTMAGNDENYSAELRNATAAMKNQVARFNDLRFVGRSGRGKSFTLTITVFTNPPQVATYHRAIKITVDGPREPRRHQKLLD
alphaC 70 DSPNPLCSVLPTHWRCKNTLPIAFKVVALGEVDPDGLTVTMAGNDENYSAELRNATAAMKNQVARFNDLRFVGRSGRGKSFTLTITVFTNPPQVATYHRAIKITVDGPREPRRHQKLLD
runt 121 GSPSILCSALPNHWRCKNTLPIAFKVVALGDVDPDGLTVSIKCGNDENYCGELRNCTTTMKNQVAKFNDLRFVGRSGRGKSFTLTITVFTNPPQVATYHRAIKITVDGPREPRRHQKLLD

AML1a 186 QTKPGSLSFSERLSELEQLRTAMRVSPHHPAFTPNPRASLN-HSTAFNPQPOSQMDTRQIQSPSPWSYDQSY-QYLGSIASPSVHPATPISPGRASGMTTL-----
alphaA 229 -SKP-SL-FSDRLSBLGRIPHSMRV---GVPPONPRPSLNSAPSPFNPOGQSQITDPRPQAQSSPWSYDQSYPSYLSQMTSPSIHSTELSSSTRGTGLPAITDVPRIISDDDTATSDF
alphaB 186 QTKPGSLSFSERLSELEQLRTAMRVSPHHPAFTPNPRASLN-HSTAFNPQPOSQMDTRQIQSPSPWSYDQSY-QYLGSIASPSVHPATPISPGRASGMTSL-----
alphaC 190 QTKP---FPDRFGDLERLR---MRVTF---STPSRPGSLT-TTSHFSSQPQTPIQ-----
runt 236 ----SYGYPHPGAFNPFMLNPAWLDAAAYMT-----YGYADYFRHQAAAQAQVHHFA-----IAKSSASSVSPNPNPSVATSSSSAVQPSEYPHPAAAVAAAAGQ

AML1a 287 SAELSSRLS---TAPDLTAFSDPRQF---PALPSISD---PRMHYPGA---FTYSPTPVTSGIGI-----GMSAMGSATRYHTYLPPPYPGSSQAQGGPFQASSPSYHLYYGAS
alphaA 342 CLWPSLKKSQAGASESLGPFSDPRQF---PSISLTSRPSNPRMHYPAT---FTYTP-PVTSGMSL-----GMSATT---HYHTYLPPPYPGSSQAQGGPFQASSPSYHLYYGAS
alphaB 288 SAELSSRLS---TAPDLTAFSDPRQF---PTLPSISD---PRMHYPGA---FTYSP-PVTSGIGI-----GMSAMSSASRYHTYLPPPYPGSSQAQGGPFQASSPSYHLYYGAS
alphaC 235 -----GTSELNPFSDPRQFDRSFTPLPTLTSRFPDPRMHYPGAMSAAPYS---ATPSGTSISSLSVAGMPATS---RFHHTYLEPPPYPGAPQNSGPFQANPSYHLYYGAS
runt 326 ----PSAMMPSPGAAPATPYAIP-QF--PFNHVAAAAAATAATPHAFHP-----YNFA---AAAGLRARNALHHQSEPVHVPASSRPSSSSPTQOHVLLKLNTSIETSSIHEQSASD

AML1a 384 AGSYQFSMV-----GGERSPPRIIPCTNASTGFA---LLNPSLPNQSDVVEAGSHSNSTNMAPSARLEEAVWRPY
alphaA 445 SASYQFPMVP-----GGDRSPSRMVPPCTTTNGST---LLNPNLPNQSDVVEAGSHSNSTNMAPSARLEEAVWRPY
alphaB 385 AGSYQFSMV-----GGERSPPRIIPCTNASTGAA---LLNPSLPNQSDVVEAGSHSNSTNMAPSARLEEAVWRPY
alphaC 450 SGSYQFSMVA--GSSSGGDRSPTRMLASCTSSAASVAAGNLNPNSLGGQSDGVEADGSHSNSTNMAPSARLEEAVWRPY
runt 434 GDSDDEQIDVVKSEFDLKDLDVAFLMRCDLKAPSSMKPLYHESGP--GAVANSRQSPETTTKIKSAAVQOKTVWRPY

```

図3.1.7B Runtファミリー蛋白質のアミノ酸配列比較

3.1.8 β サブユニットcDNAのクローニング

我々のグループは、 β サブユニットのcDNAも同様にクローニングにも成功し、このサブユニットにもディファレンシャルスプライシングに起因する3タイプ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、および $\beta 3$)のサブタイプが存在していることを示した[Ogawa et al., 1993b] (図3.1.8)。 β サブユニットには、 α サブユニット同様に既知のDNA結合、タンパク-タンパク相互作用モチーフも存在していないが、つい最近、ショウジョウバエでのホモログが見つかった[Gollinger et al. 1993]。これについては考察中で述べる。 β サブユニットを大腸菌発現系、COS細胞系、in vitro転写系いずれで発現させても単独ではDNAに結合しないが、このサブユニットは α サブユニットとヘテロダイマーを形成することによって、 α サブユニット単独の時よりも安定なDNAとの複合体を形成することを示した。この結果はマウスから精製された β サブユニットの解析による結果と一致する。またノーザンブロッティング解析により、このサブユニットは細胞種によらず普遍的な発現を示すことが明らかになった。

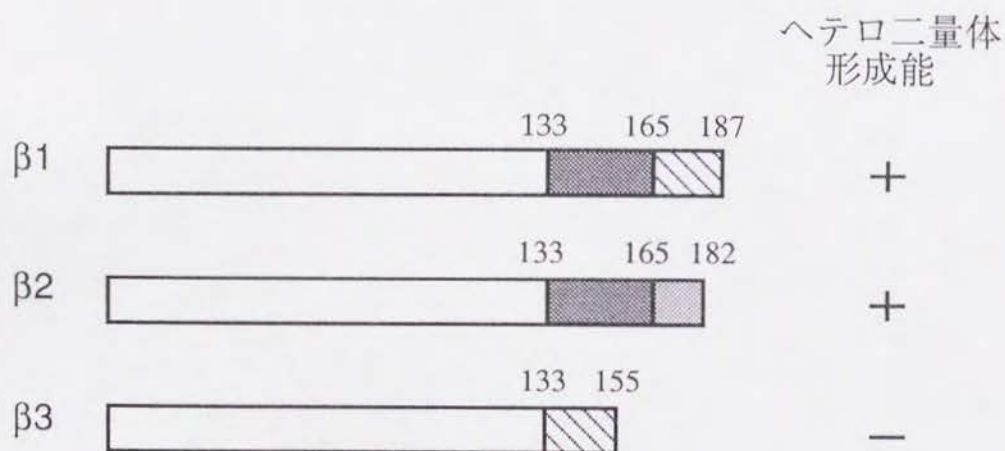


図3.1.8 PEBP2 β サブユニットの3つのcDNA産物

図中網掛け部は同じアミノ酸配列を持つことを示す。
右のカラムは各 β サブユニットの α サブユニットとの
ヘテロ二量体形成の能力を+、-で示した。

3.1.9 α A1、 α A2 cDNAクローン産物の検討

以上のようにして得たcDNAクローン α A1、 α A2が真にPEBP2 α サブユニットに対応するものであるかどうかを確認するため、まずその翻訳を、大腸菌発現系、およびin vitro翻訳系で行った。産物蛋白質の大きさはいずれもSDS-PAGE上で、cDNA配列からの推定分子量とほぼ一致した。

続いてこれらのcDNA産物が、 α サブユニットとして期待された分子活性を持つかどうかをEMSAによって解析した。その結果、 α A1、 α A2サブユニットはいずれも、マウスの α サブユニットと同様に単独でDNA結合活性を持ち、 β サブユニットを加えることによってバンドの上方へのシフト、および増強が観察されヘテロダイマーの形成が起こっていることが確認された。従って我々が単離した α A1、 α A2のcDNAクローンは、PEBP2 α サブユニット由来のものであることが確証された[Ogawa et al., 1993a]。

3.2 α 、 β サブユニットの分子機能解析

3.2.1 α Aサブユニットの増産、精製

我々は α Aサブユニットの持つDNA結合能、および β サブユニットとのヘテロ二量体形成能というのがそれぞれどの領域に局在するかを決定するために系統的な欠損解析を行った。このためにpQE発現ベクター系(QIAGEN)を用いて、大腸菌で様々な形の α サブユニットの増産させた。pQE発現プラスミドベクターでは、N末端に6つの連続したヒスチジン残基(ヒスチジンタグ)を付けた形で目的蛋白を発現させることができる。ヒスチジンタグのついた蛋白質は、ニッケル-アフィニティーカラムを用いることにより、粗抽出液から直接、簡便に、かつ高度に精製することができる[Hochuli et al., 1987, 1988]。この方法によって大部分の蛋白はニッケル-カラムのみで精製できたが、全長の α サブユニット(α A1、 α A2)、およびN末端からの欠損 α サブユニット(α N94、 α N113、 α N140)の標品については、C末端側からの分解産物と思われる不純物が含まれるため、さらにSDS-PAGEで泳動を行い、これから目的のバンドを切り出し精製を行った(図3.2.1)。

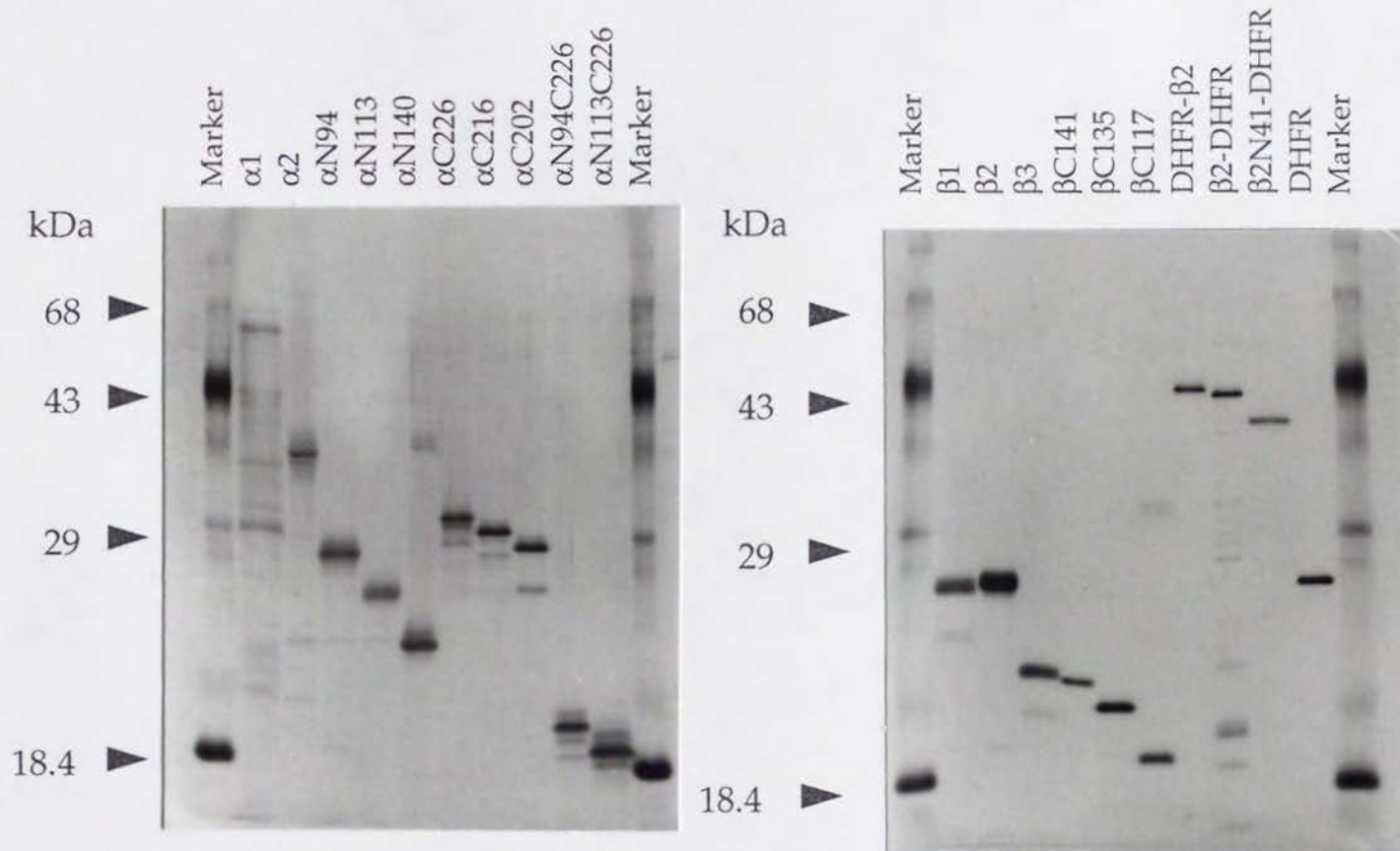


図3.2.1 精製 α 、 β サブユニットのSDS-PAGEによる解析

各欠損、融合サブユニットは、そのN末端に付けたヒスチジンタグによって、ニッケル-アフィニティーカラムを用いることにより、粗抽出液から精製した。大部分の蛋白はこのニッケル-カラムのみで精製できたが、一部のサンプルはこれだけでは不十分であったため、さらにSDS-PAGEで展開後、目的のバンドからサンプルを溶出して精製した。

各サブユニットの欠損変異体の名称はN末端の何番目の残基からあるか、C末端の何番目の残基までであるかによって示した。これは、例えば" N94"はN末端が94番目の残基から始まること、" C226"はC末端が226番目で終わることを表わす。また、 β サブユニットについてはDHFRを融合させた変異体も構築し精製した。" DHFR"の位置は、これがN末端、C末端のどちらに融合されているかを示す。

3.2.2 ゲルシフト法(EMSA)による α Aサブユニットの機能解析

前述のようにして精製した一連の欠損 α Aサブユニットを用いてゲルシフト法(EMSA)を行い、 α Aサブユニットの持つDNA結合能、および β とのヘテロダイマー形成能を担う領域を解析した(図3.2.2)。

初めにDNA結合領域について述べる。まず、最長のcDNA産物 α A1はDNA結合活性は持つものの非常に微弱ではあるあるのに対し、もう一方の α A2は十分強いDNA結合活性を示した。そこで欠損変異体はこの α A2をもとにして作成した。N末端欠損 α サブユニットは、 α N80、および α N94まで十分強くDNAに結合する。 α N113はDNA結合活性をまだ持っているが、その強さは α N94に比べかなり下がってしまう。また、さらにN末端側から28アミノ酸残基削り進んだN140変異体は結合活性を完全になくしてしまう。

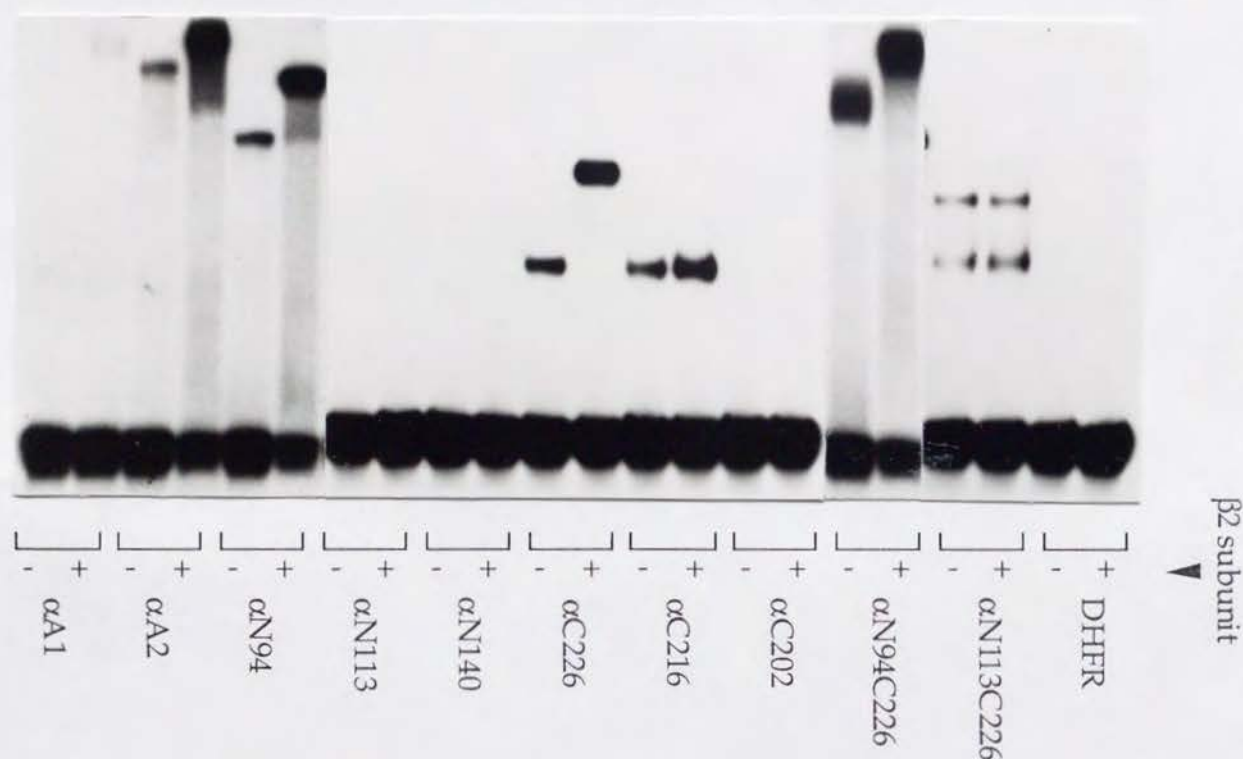


図3.2.2 EMSA法による欠損 α Aサブユニットの機能解析

EMSA反応に用いた蛋白質量(ng)は以下の通り： α A1, 50; α A2, 10; α N94, 5; α N113, 50; α N140, 100; α C226, 5; α C216, 100; α C202, 100; α N94C226, 0.5; α N113C226, 50; DHFR, 100。各レーンの-、+は β 2サブユニットの有無を表わす。なお、DHFRはジヒドロ葉酸還元酵素にヒスチジンタグがついた形のもので、ここではネガティブ対照実験のために用いた。

一方、C末端欠損 α サブユニットでは、 α C226までは十分DNA結合活性を示すが、さらに10アミノ酸残基削った α C216は全く不活性であった。これらの結果からDNA結合活性に必要な最小領域は113から226アミノ酸の間に含まれることがわかった。しかし、十分なDNA結合活性を発揮するためには、94から112アミノ酸の領域がさらに必要なことも明らかになった。

続いて β とのヘテロ二量体形成を担う領域について述べる。 α A1および α A2は、いずれも β とヘテロ二量体を形成して、単量体の場合よりも高い位置に、より強いバンドを形成する。 α N80、および α N94変異体は α A1、 α A2同様に β サブユニットとヘテロ二量体形成能を持つが、 α N113はこの活性を失ってしまう。一方、C末端を欠失させた場合、226アミノ酸までの領域が存在すれば、DNA結合活性も、ヘテロ二量体形成能もともに持つことがEMSA法によりわかったが、これよりもC末端側をさらに欠失したサブユニットはDNAに結合しないため、EMSA法は適用できない。そこでタンパク-タンパク親和性カラムを用いて、この機能のC末端領域を解析を進めた。

3.2.3 タンパク-タンパク親和性カラムを用いた α Aサブユニットの機能解析

α 、 β サブユニット間の相互作用を明らかにするために、精製時に用いたヒスチジントッグとニッケル-カラムとの結合を利用し、次のような手順で解析を行った。ヒスチジントッグが付加されたC末端欠損 α サブユニットと、トッグのついていない β 2サブユニットをACAバッファー中で結合反応を行わせ(2.2.13節参照)、ニッケルカラムにのせ、40 mMおよび250 mMのイミダゾールを含むACAバッファーで洗浄、溶出する。 α サブユニットはヒスチジントッグが付加されているので、40 mMイミダゾールのバッファーでは溶出されず、250 mMのバッファーで初めて溶出される。一方、 β サブユニットにはヒスチジントッグがないため、そのままでは40 mMのバッファーで溶出されてしまうが、 α サブユニットが β とヘテロ二量体を形成している場合、 β サブユニットは250 mMのバッファーを用いた時に α サブユニットと一緒に溶出される(図3.2.3A)。まず、 β サブユニットとのヘテロ二量体形成能がEMSAによって確認されている α N80C226をポジティ

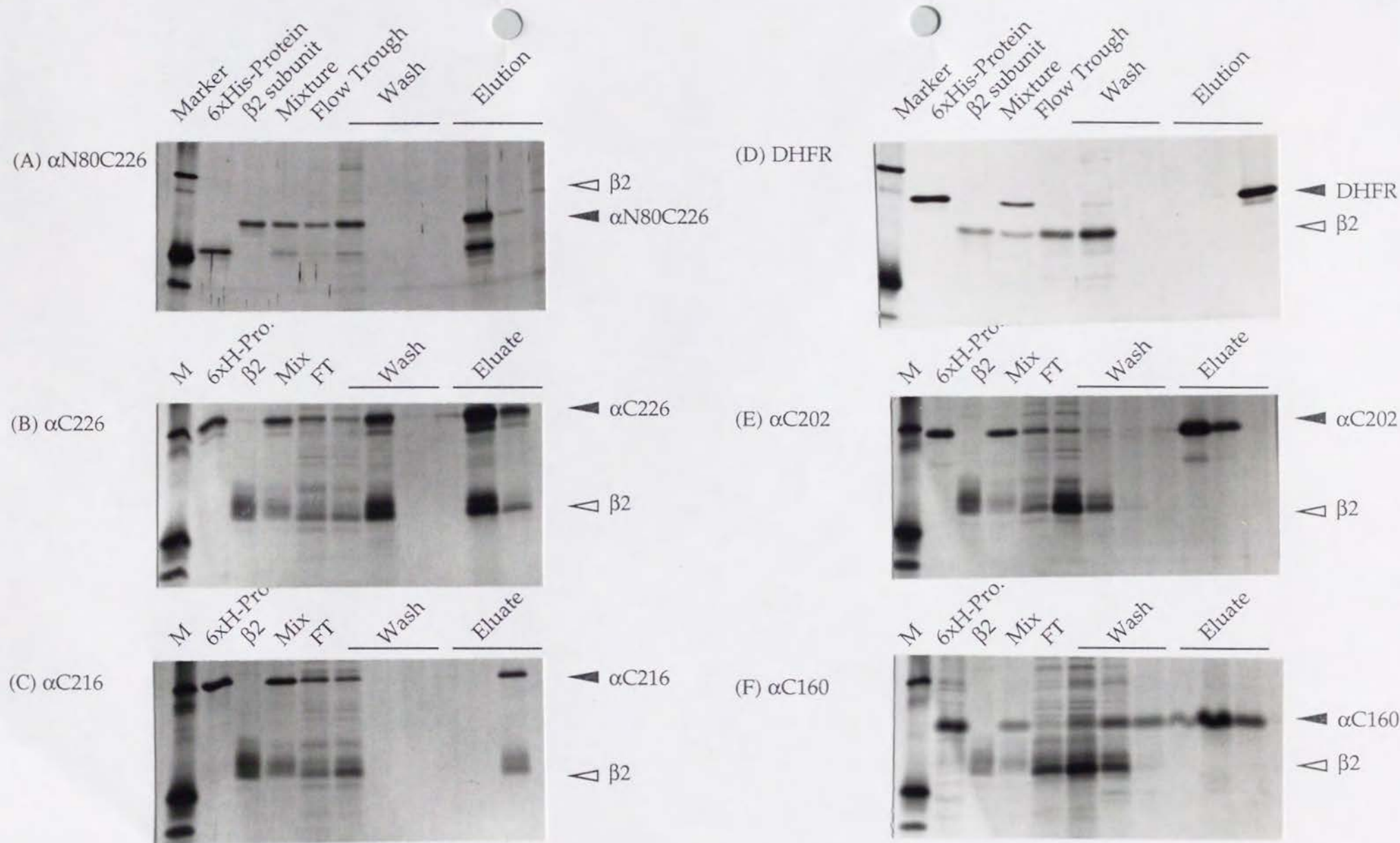


図3.2.3A タンパク-タンパク親和性カラムを用いた α サブユニットのヘテロ二量体形成領域の解析

各図において、左上に示した蛋白質にヒスチジンタグをつけたものをそれぞれ用いた。レーンは左から、分子量マーカー、サンプル、 β 2サブユニット、カラムにのせる前の結合反応液、カラム透過液、洗浄液および溶出液(各3レーン)を示す。各図の右側にサンプル、および β 2サブユニットの位置をそれぞれ黒矢印、白矢印で示した。

ブコントロールに、またPEBP2とは全く無関係なジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)をネガティブコントロールに用いた実験で、この予想の通りの溶出パターンとなることを確認した。そこで、さらに他のC末端欠損 α サブユニットについて見ると、 α C216までは二量体形成能を持つが、それより上流の欠損変異体はすべて不活性であった。

以上のEMSA法、およびACA法による解析の結果を総合すると、DNA結合のためには113番目から226番目のアミノ酸の領域が、ヘテロ二量体の形成のためには94番目から216番目のアミノ酸の領域が必要であることがわかった。これらの結論は、N、C両末端からの欠損変異体 α N94C226、 α N113C226に対しても成り立つ。以上によって α サブユニットの二つの機能領域は、ほぼ完全にRunt domain (93番目から220番目のアミノ酸の領域)に一致することが確立した(図3.2.3B)。

3.2.4 Runt family遺伝子群(PEBP2 α 、Runt、AML1)におけるRunt domainの機能比較

既に述べたようにRunt domainのアミノ酸配列は、三つのメンバーPEBP2 α サブユニット、runt、AML1の間で非常に高い相同性を示す。すなわちPEBP2 α AサブユニットとAML1の間では実に91%が一致し、さらに7%が保存的置換となっている。Runtと α A/AML1の間でも65%が一致し28%が保存的置換である(図3.1.7)。

そこでRuntとAML1についてもRunt domainが α Aのそれと同様に特異的DNA結合能、ヘテロ二量体形成能を持つかどうかを検討した(図3.2.4)。この時、AML1遺伝子産物としては、AML1のRunt domain部分のN末端にグルタチオン-S-転移酵素(GST)を融合した形の精製蛋白を用いて実験した(本融合蛋白は、国立癌センターの大木操教授のグループから提供された)。一方、runt遺伝子産物としては、runtのRunt domain部分のN末端にヒスチジンタグを融合した形の蛋白を用いた。その結果、AML1は α Aと同様に強いDNA結合活性とヘテロ二量体形成能を示した。一方、runtは通常用いていた6%ゲルで、室温での泳動では、 β サブユニットの有無にかかわらずシフトバンドは検出できなかったが、ゲル濃度を15%まで上げ、4℃で泳動したところ、ようやく単独でも微弱ながらバンドが検出されるようになり、さらに β サブユニットの存在下で明瞭なスーパーシフ

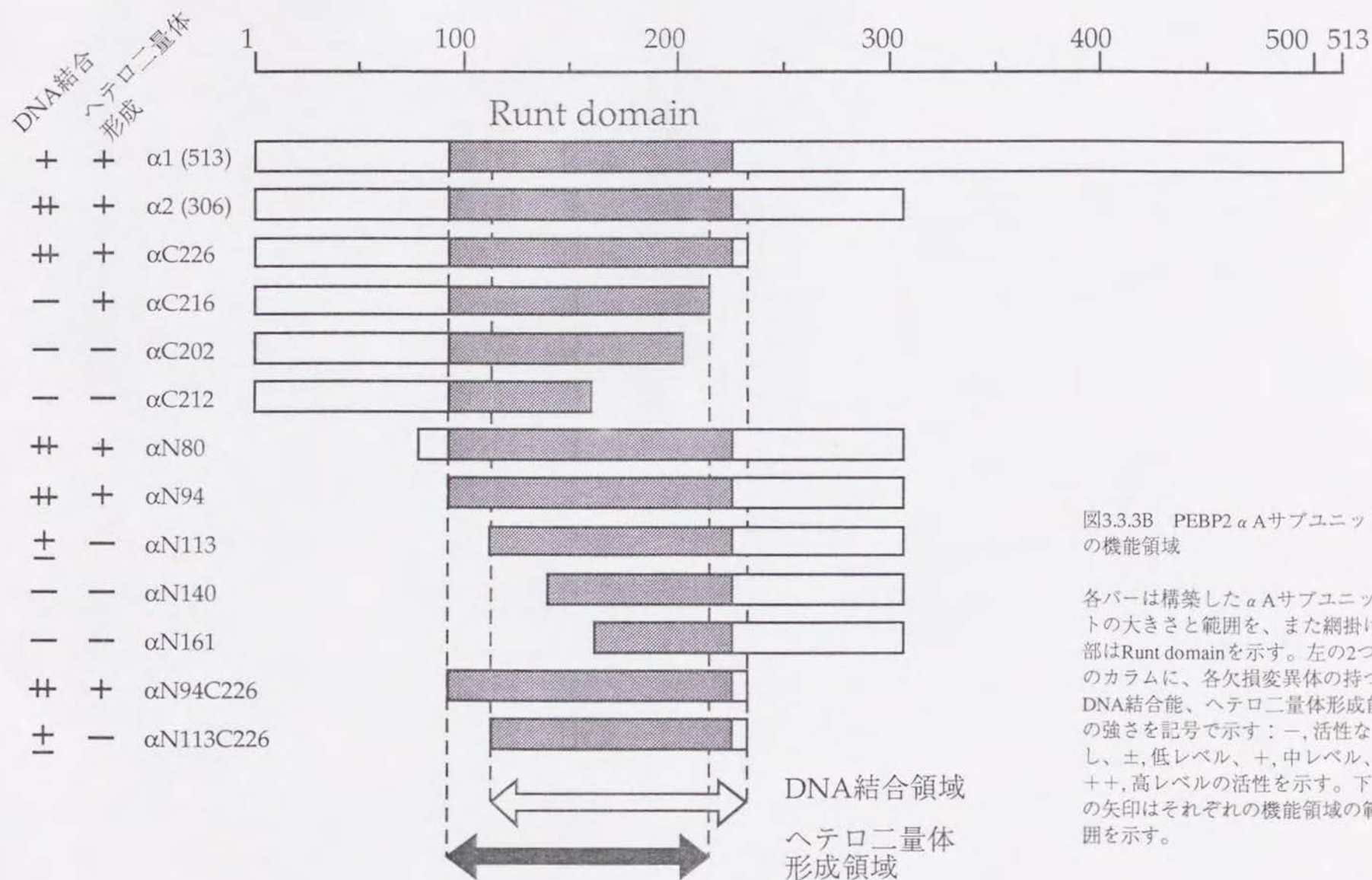


図3.3.3B PEBP2 α Aサブユニットの機能領域

各バーは構築した α Aサブユニットの大きさ、また網掛け部はRunt domainを示す。左の2つのカラムに、各欠損変異体の持つDNA結合能、ヘテロ二量体形成能の強さを記号で示す：-、活性なし、±、低レベル、+、中レベル、++、高レベルの活性を示す。下の矢印はそれぞれの機能領域の範囲を示す。

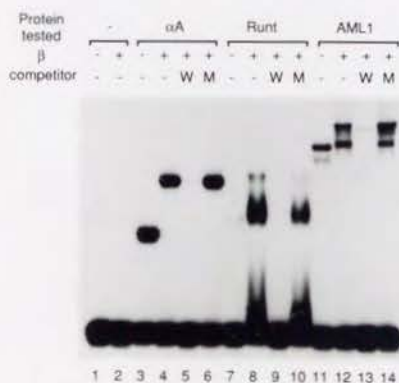
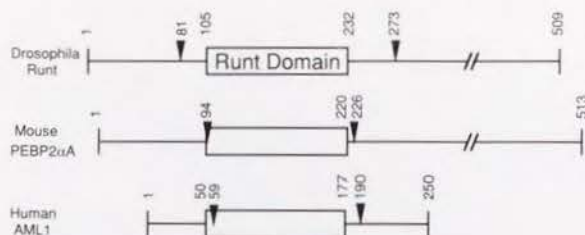


図3.2.4 Runtファミリー遺伝子群 (PEBP2 α A、Runt、AML1)における Runt domainの機能

上図：Runtファミリー蛋白質の構造模式図。Runt domainの位置を四角で、用いた組み換え体の領域を黒矢印で示した。

下図：精製蛋白質を用いたEMSA解析によるゲルパターンを示す：レーン1, 2, Runt domainなし；レーン3 - 6, PEBP2 α A (N94C226)；レーン7 -10, runt (N81C273)；レーン11-14, AML1 (N59C190)。 β ：+, -, β 2サブユニットの有無、competitor: W, 野生型；M, 変異型；-, なしの非標識プローブの添加を示す。

トバンドを示すようになった。このことから runt の PEBP2 配列に対する DNA 結合活性はかなり低く、通常の実験条件では泳動中に、蛋白質-DNA の複合体が解離してしまうものと考えられる。

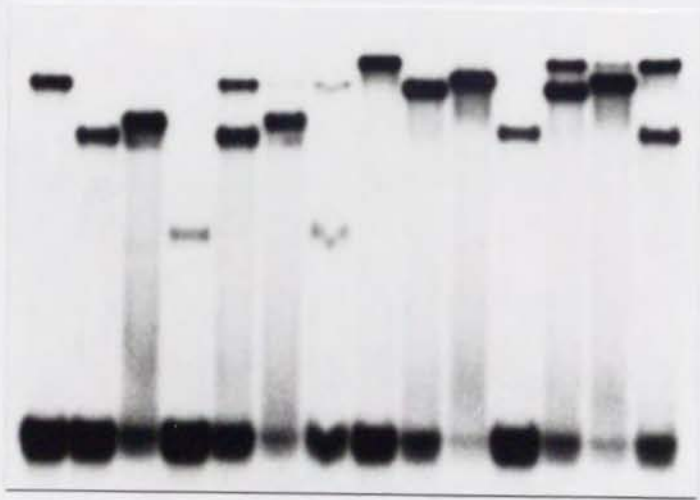
以上のように、どの Runt family 遺伝子群メンバーの Runt domain も活性の強さに多少の差はあるものの、二つの基本的機能、すなわち DNA 結合能、ヘテロ二量体形成能をとくに保持していることが証明された [Kagoshima et al., 1993]。

3.2.5 α A サブユニットの単量体結合性

転写因子の DNA への結合様式は一般に単量体として結合する場合と、二量体あるいはそれ以上の形で結合する場合の二通りが知られている。PEBP2 α サブユニットについては、以前マウスから精製した標品を用いた解析の結果から、単量体の形で DNA に結合すると結論している [Ogawa et al., 1993a]。しかしこの問題は基本的に重要であるので、今

回様々な大きさの α サブユニット欠損体が純粋な形で得られたのを利用して、より厳密な再検討を行った。

実験は4種類の欠損 α サブユニット(α A2、 α N94、 α C226、 α N94C226)を単独で、または2種類を混合して用い、EMSA法によってその解析を行った。この時、 β 2サブユニットの有無によって結合が変化するかどうかについても調べた。この結果、2種類の α サブユニットを混合しても、初めから検出されていた二本のバンドを生じるのみで、これらの中間の移動度を持つようなバンドは生じなかった。また、 β サブユニットを加えた場合はそれぞれの α サブユニットで、ヘテロ二量体による移動度の小さいバンドが独立に生じるだけで、やはり中間の移動度を持つバンドは生じなかった。従って、 α サブユニットはやはり単量体としてDNAに結合することが再確認された。



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
α A2	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
α N94	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
α C226	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
α N94C226	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
β 2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

図3.2.5 α Aサブユニットの単量体結合性の検定

図左下に示した各種の α サブユニット欠損体を単独(レーン1-4, 8-11)、もしくは α A2と組み合わせて(レーン5-7, 12-14)、 β 2サブユニットの非存在下(レーン1-7)、存在下(レーン8-14)でEMSA解析を行った。

3.2.6 α Aサブユニットにおける分子内、分子間相互作用の検討 -欠損 α Aサブユニットによる定量的解析-

これまでに β サブユニットには、 α サブユニットと結合しヘテロ二量体を形成することによって、 α 単量体の場合よりも高い位置にバンドをシフトさせるだけでなく、バンドの濃さを目に見えて増強する働きがあることをすでに述べたが、一連の欠損解析の過程で、欠損の程度が少ないほど、 β サブユニットによる活性上昇の程度が大きくなるような傾向が認められた[Ogawa et al., 1993a]。このことから、より大きなサイズの α サブユニットには単量体でのDNA結合活性を負に制御するようなドメインが存在しているのではないかと、想像された。このような分子内相互作用によってDNA結合に対して抑制的に働くドメインは、従来NF- κ B、Etsなどで報告されており、Runt domainの機能制御においても同様なドメインが介在している可能性が考えられた。そこで5つのタイプの α サブユニット(cDNA産物: α A1、 α A2、欠損変異体: α N94、 α C226、 α N94C226)を用いて、DNA結合活性の定量的解析を行い、 β による結合活性の上昇応答の差を測定することによって、この抑制的機能ドメインの存否について検討した。

大腸菌で増産・精製した α サブユニットを用いて定量的解析を行った場合、 β サブユニットとヘテロ二量体を形成したときに、 α サブユニットの見かけ上の最大結合活性が単量体での場合よりも大幅に上昇した。この実験において、投入した α サブユニットの絶対量は同じに設定していたので、以前報告されたように β サブユニットがDNAとの親和性を高めているだけならば[Ogawa et al., 1993b]、最大結合活性は一定となるはずであり、この結果は意外に思われた。このような食い違いを生じた原因として、投入した α サブユニットのうち一部分が不活性な状態で存在しており、これらが添加した β サブユニットと相互作用することによって活性形へと変換されている可能性が考えられた。不活性な α サブユニットが存在している理由として次のようなことが考えられる。まず、実験に用いた α サブユニットは大腸菌で発現させたものであるため、蛋白に適切な翻訳後修飾が起こらなかった可能性、あるいはニッケルアフィニティーカラムや、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製の各段階において蛋白に何らかの化学的変化が

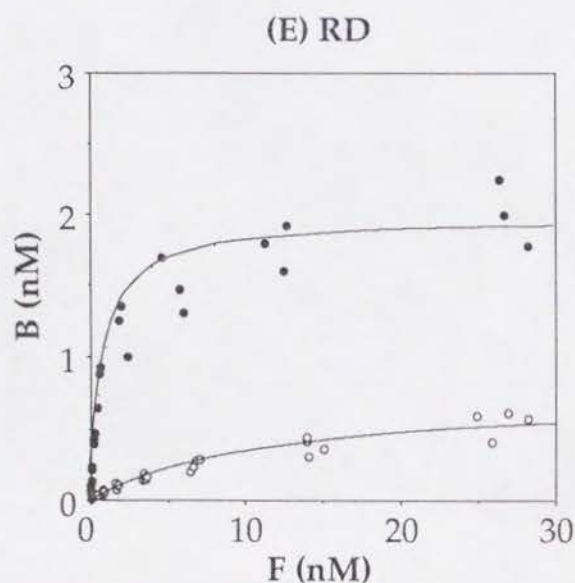
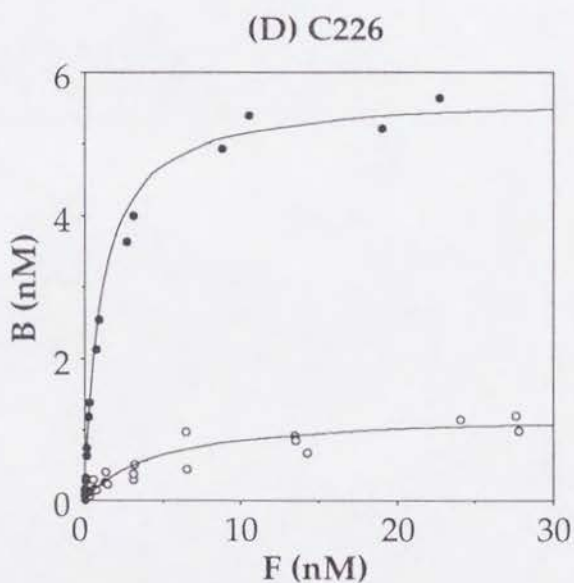
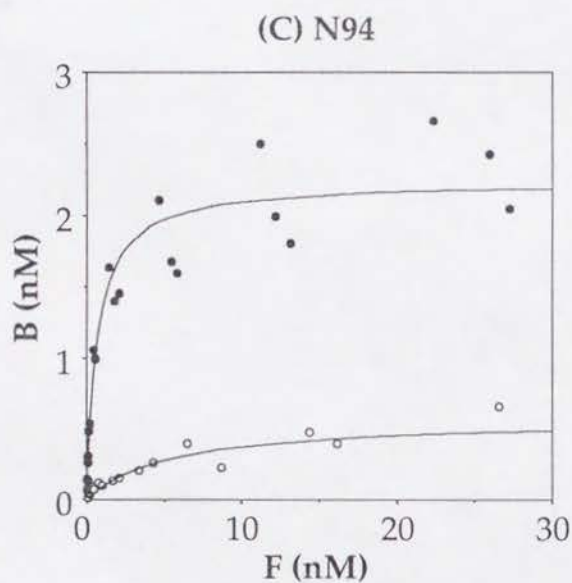
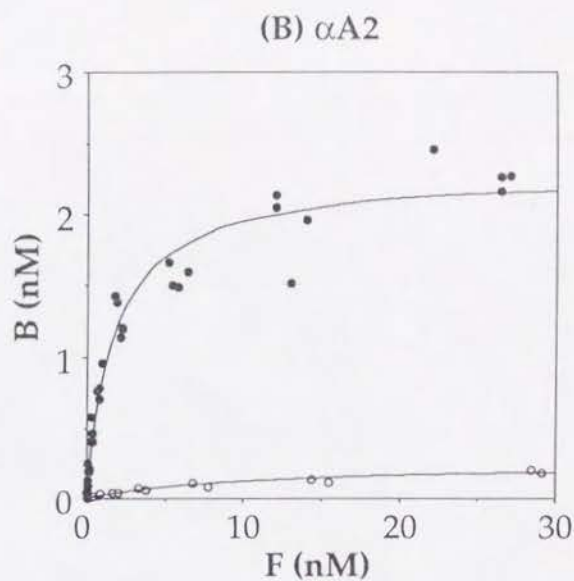
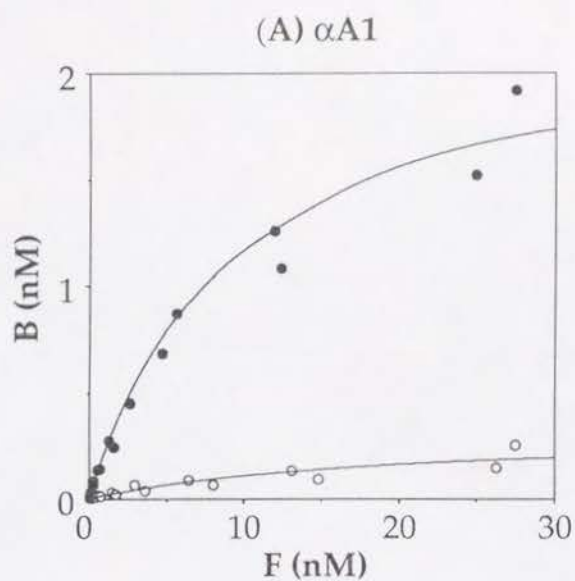


図3.2.6 β サブユニットによる αA サブユニットのDNA結合活性促進の定量的評価

各図の上を示した α サブユニットとその欠損変異体を単独(○)、および $\beta 2$ サブユニット($10 \text{ ng} / \mu\text{l}$)の共存下(●)で、 $0.125 - 32 \text{ nM}$ のプロープDNAと反応させ、EMSAを行った。各 α サブユニット標品の最終濃度は $0.5 \text{ ng} / \mu\text{l}$ ($\alpha A2$, N94, RD、または $1 \text{ ng} / \mu\text{l}$ ($\alpha A1$, C226)に固定した。横軸(F)は遊離DNAの濃度(nM)、縦軸(B)はシフトバンドとして検出された蛋白質-DNA複合体の濃度(nM)を示す。

発生した可能性、または透析による再活性化が不十分であった可能性などが考えられる。

そこで、我々はより自然の状態に近い蛋白質を得るために、ウサギ赤血球抽出液を用いたin vitro翻訳系(Promega)によって、一連の α サブユニットを合成し、DNA結合活性の定量的解析を行った。しかし、この系を用いて合成した産物による解析でも、大腸菌で合成した場合と同様に、 β サブユニットの添加による最大結合活性の上昇が観察された。

従って β サブユニットによる α サブユニットの最大結合活性の上昇は、上にあげたような実験上のアーティファクトではなく、 α サブユニット本来の性質を反映したものであると判断された(データ省略)。in vitro翻訳系を用いた場合、十分量の蛋白が得にくい
ため、結局我々は大腸菌で増産させた蛋白を精製してこの定量的解析を先に進めることにした。

当初 β サブユニットによる α サブユニットの活性型への変換は、Runt domainの外側の特定の領域に依存しているのではないかと推測したが、最終的にいずれのタイプの欠損変異体も、 β サブユニットを加えると最大結合活性が上昇することがわかり、推測していたような抑制的ドメインを特定することはできなかった(図3.2.6)。

本解析中、 α - β ヘテロ二量体の活性は比較的安定していたが、 α サブユニット単量体の活性は非常に不安定で、全く同じ実験条件で行っていても、データの振れが大きく定量的な解析が困難であった。この困難を解決するために、 α サブユニットの活性を左右する要因について検討を重ねた結果、その不安定性の原因が次項3.2.7で述べる α サブユニットの疎水的接着性、そして、次節3.3で述べる α サブユニットの酸化還元調節にあることが明らかになった。

3.2.7 α サブユニットの疎水的接着性

DNA結合性の定量的解析を進める過程で、 α サブユニット単量体は濃度が低くなるとその比活性が急激に低下し、そのため極端にS字型の濃度-活性曲線を示すことに気付いた(図3.2.7)。この傾向は欠損の程度によらず α サブユニット全般について認められた。さらにこの現象は、EMSA反応液に高い濃度の還元剤(100 mM DTT)を加えること、およ

び実験に用いるプラスチック製のチップ、チューブをシリコナイズすることによって相乗的に軽減されることがわかった。そこで、以後の実験はすべて、反応液には100 mM DTTを加え、また実験機具にはシリコナイズしたプラスチック製を用いてEMSA解析を行った。

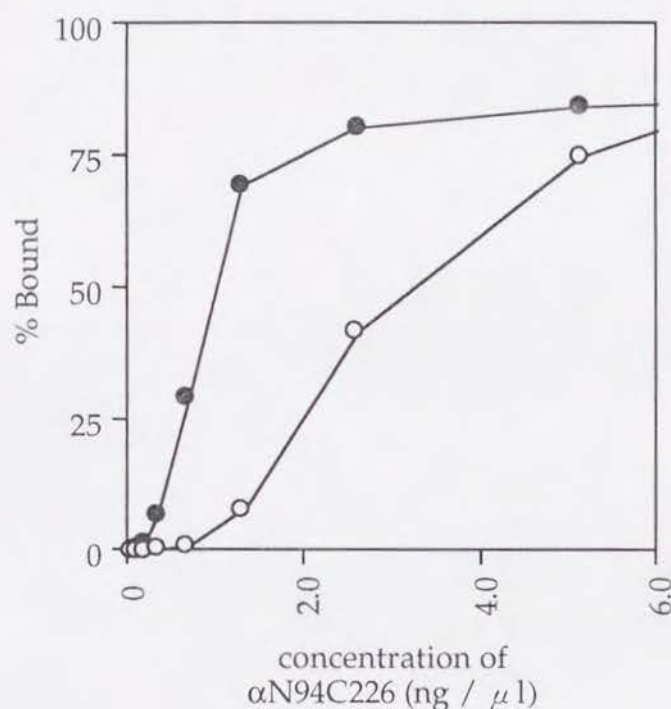


図3.2.7 α サブユニットの濃度依存性結合活性

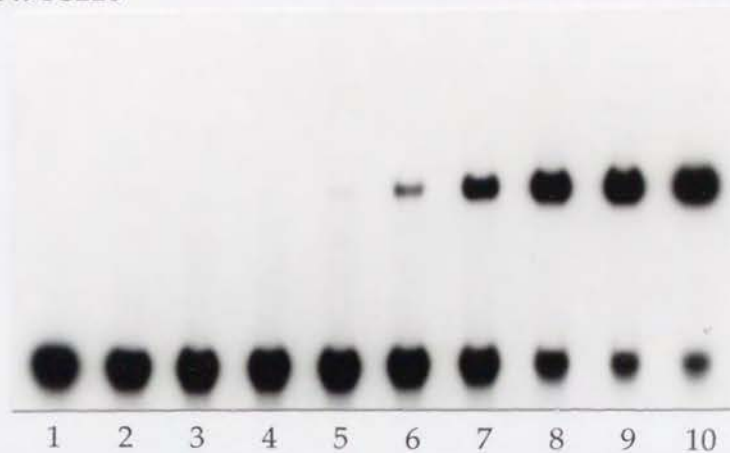
DNAプローブの濃度を固定(10 nM)し、 α サブユニットN94C226の濃度を0.01 - 5.12 ng / μ l の範囲でふってその結合活性を測定した。結合反応は次の二つの条件で行った：(○), 1mM DTT, 無処理チューブ；(●), 100mM DTT, シリコン処理チューブ。グラフの横軸は α N94C226の濃度を、縦軸は投入DNAプローブのうち何%が結合したかを示す。

3.2.8 α サブユニットのDNA結合活性に対する β サブユニットの効果

EMSAにおいて β 1、 β 2などのヘテロ二量体形成能をもつ β サブユニットを、 α サブユニットに加えると、単量体の場合よりも上方にシフトし、増強されたヘテロ二量体のバンドの形成されることはすでに述べた。この効果は、特に α サブユニットの濃度が低い場合に顕著に観察され、 β サブユニットを加えない場合、単量体のバンドは1.6 ng / μ lの濃度で初めて検出されるが、 β 2サブユニットを加えた場合、ヘテロ二量体のバンドは0.2 ng / μ lの濃度で現われるようになった(図3.2.8A)。

ここで観察されるバンドの増強が起こる原因として大きく二つの原因が考えられる。一つ目は、複合体とDNAとの間の解離定数の低下、すなわち複合体全体の安定性の上昇が起こる場合(K_d の減少)、二つ目は、単量体では不活性型の構造をとっている α サブユ

(A) α N94C226



(B) α N94C226 + β 2



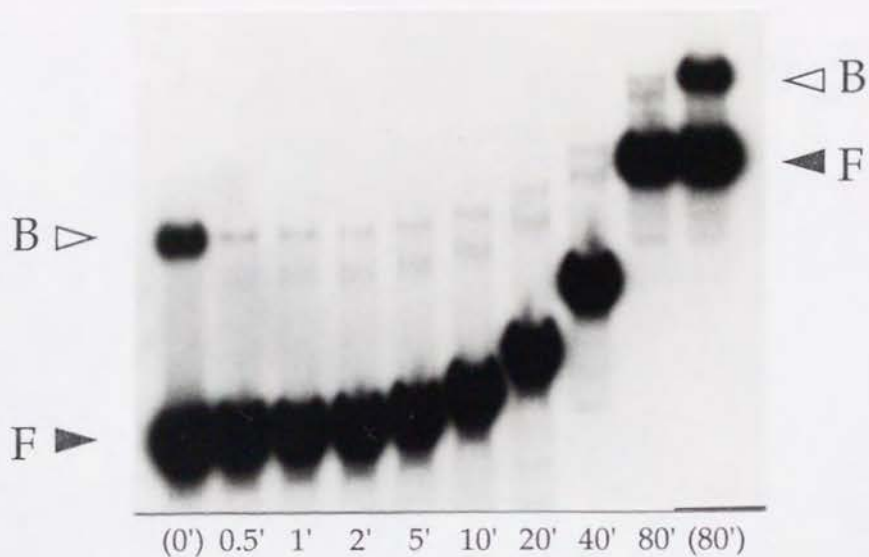
(C) α N94C226 + β 3



図3.2.8A α サブユニットの結合活性に対する β サブユニットの効果

一定濃度のDNA(nM)に対して、 α N94C226の濃度を変化させながら、 β 2もしくは β 3サブユニットの存在下、および非存在下でEMSA解析を行った。各レーンでは α N94C226を：1, 0.01; 2, 0.02; 3, 0.04; 4, 0.08; 5, 0.16; 6, 0.32; 7, 0.64; 8, 1.28; 9, 2.56; 10, 5.12の濃度($\text{ng} / \mu\text{l}$)で用いた。

(A) α N94C226



(B) α N94C226 + β 2

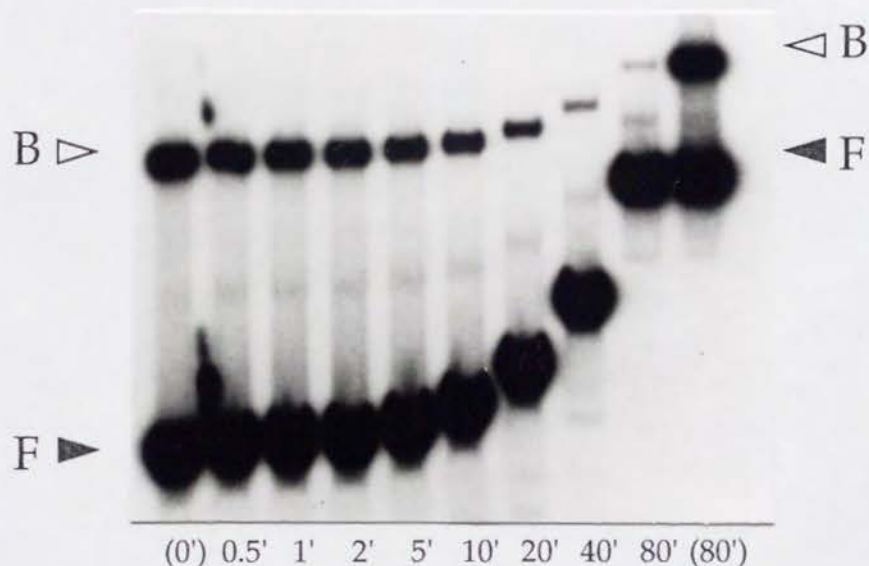


図3.2.8B β サブユニットによる α サブユニット-DNA複合体の安定化

α サブユニットを単独(A)、および β サブユニット共存下(B)で、1 nMの標識プローブと25℃で30分間インキュベートして結合反応を充分に行わせた後、50倍当量の非標識プローブを加え、4℃にて競合反応を開始し、経時的にサンプリングしてEMSA解析を行った。なお、サンプルのロードは通電させながら行ったため、後になる程バンドの移動度は小さい。B、FはそれぞれDNA-蛋白質複合体と遊離のプローブの位置を示す。横軸の数字は競合反応開始以後の経過時間(分)を示す。なお、対照として、レーン(0')および(80')には、非標識プローブを加えずそのまま4℃に保存した場合のパターンを示す。

ニットが、 β サブユニットによって活性型の構造に変換され、DNAに結合できる α サブユニットの増加が起こる場合(Pmaxの増加)である。この項では複合体の解離速度についての検討を行い、 β サブユニットによる構造変換については3.2.10項で検討する。

まず、標識プローブとRD単量体、あるいはヘテロ二量体の結合反応を、EMSA反応液中で行い、ここに大過剰の非標識プローブを添加した。引き続き反応液を時間経過に応じてサンプリングし、EMSAゲルで展開を行った(図3.2.8B)。これによって複合体とDNAとの間の解離速度を、シフトバンドがどの位の時間で消失するか観察することによって測定した。この結果、単量体は1分以内にバンドが消失してしまい、複合体が極めて不安定であることがわかった。一方、ヘテロ二量体の場合シフトバンドは80分以上も残ることから、DNA-蛋白質複合体が非常に安定化されていることがわかった。これらの結果から、 β サブユニットは α サブユニットとヘテロ二量体を形成することによって、複合体とDNAの結合を安定化させることが確認された。なおこの実験では、 α サブユニットのモデル系としてRDを用いて測定したが、他の欠損サブユニットを用いても同様の結果が得られた。

3.2.9 β サブユニットのヘテロ二量体形成能領域

α サブユニットとのヘテロ二量体形成を担う β サブユニットの領域を明らかにするため、まずN末端にヒスチジンタグを融合した形の一連の β サブユニット欠損変異体が大腸菌で産生した。続いて、これを α サブユニットの場合と同様に精製し、EMSAによってヘテロ二量体形成能領域の解析を行った(図3.2.9)。この時 α サブユニットとして α N94C226 (RD)を用いたが、他のタイプの α サブユニットを用いても同様の結果が得られた。

まず、これまでに報告されている結果、 β 1、 β 2サブユニット、および β 1C14I変異体は α サブユニットとのヘテロ二量体形成が可能であること、 β 3サブユニットはこれができないことを確認した[Ogawa et al., 1993b]。これによって、今回の実験で用いたヒスチジンタグ β サブユニットでも全く同様の結果が得られ、このタグがヘテロ二量

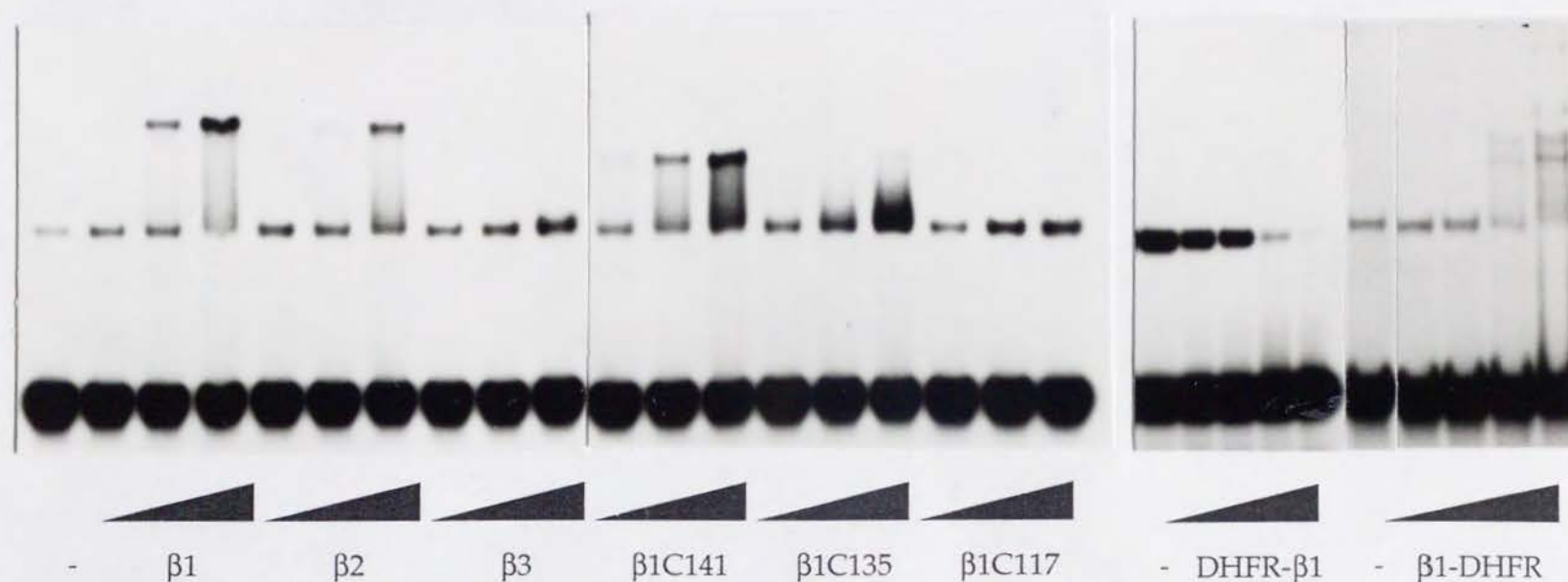


図3.2.9 EMSA法による欠損 β サブユニットの機能解析

C末端欠損変異体は $\beta 1$ から適当な制限酵素サイトを利用して構築した。それぞれの名称は基本的に α サブユニットに準じる。DHFR- $\beta 1$ 、 $\beta 1$ -DHFRはそれぞれ、N末端、およびC末端にDHFRが融合した $\beta 1$ サブユニットを表わす。反応は α サブユニットとして α N94C226を3ng用い、これに対してcDNA産物、およびC末端欠損変異体は、各サンプルごとに2、10、40ngを、またDHFR融合 β サブユニットについては0.05、0.5、5、50ngの蛋白質を加えた。なお、(-)の記号は β サブユニットを加えない反応を示す。

体形成能に対して影響がないことを確認した。引き続いて解析した β 1C135も二量体形成能を保持していたが、さらに18アミノ酸残基を欠損した β 1C117では完全に不活性であった。一方、N末端からの欠損 β サブユニットは、大腸菌体内では増産ができなかった。これはN末端欠損型 β サブユニット変異体が大腸菌に対して毒性を持つためと考えられる。このため、我々はまず β 1、 β 2サブユニットのN末端、またはC末端のどちらかにDHFRが融合した形の変異体を構築した。これら融合サブユニットの活性をEMSAによって解析したところ、C末端にDHFRを融合した形の β サブユニットをRDに加えると、不明瞭ではあるがより上方にシフトしたバンドが現われ、二つのサブユニットの間で複合体が形成しているのがわかる。他方、N末端にDHFRを融合した形の β サブユニットを加えた場合、その量を増加させるにつれてRD単量体のバンドの消失が観察された。これはこのタイプの融合 β サブユニットは α サブユニットとヘテロ二量体は形成するものの、同時にDNA結合を阻害しているためと考えられる。以上の結果、DHFR融合 β サブユニットはいずれも α サブユニットとの結合活性を保持していることがわかった。このことをふまえて、これら融合 β サブユニットをもとにしてN末端欠損変異体を構築して、 α サブユニットとの相互作用をEMSAによって解析した。これらN末端、C末端DHFR融合サブユニットの β 1、 β 2部分のN末端の欠損をN41、N51、N73、N87、N117と構築したが、いずれの変異体を加えた場合もRD単量体のバンドには全く変化が観察されなかった。この結果、 β サブユニットの二量体形成能は、N末端の初めからC末端の境界である135番目のアミノ酸の領域に含まれることが明らかになった。

3.2.10 β サブユニットによる α サブユニットの結合活性の上昇

前項の β サブユニットの欠損解析において、スーパーシフトを起こさない β 3サブユニットでも、バンドを増強する効果を持つことが観察された。この結合促進作用を検討するために3.2.8項で行った実験を β 3サブユニットを加え、RDのDNAへの結合の割合を観察した。その結果、バンドのスーパーシフトは起こらないもののその強さは著しく増強され、 β 2サブユニットを加えた場合と同じ0.2 ng / μ lの濃度で現われることが示され

た(図3.2.7)。この結果、これまで α サブユニットとの相互作用がないと考えられていた $\beta 3$ サブユニットも、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ サブユニット同様に α サブユニットと何らかの相互作用を行うことが示唆された。

さらに、この α サブユニットの結合活性を促進する性質は、 $\beta 1$ - 3 サブユニットに加えて、C末端欠損 β サブユニット $\beta 1C141$ 、 $\beta 1C135$ 、さらにヘテロ二量体形成ができない $\beta 1C117$ で認められていた。これ以上のC末端欠損変異体の作成を行わなかったため、残念ながらこの性質を持つ領域の同定はこの点までとなった。一方、N末端欠損 β サブユニットについては、融合サブユニットによる解析しかできず、しかもこれらが形成するヘテロ二量体はEMSAゲル上でバンドをまったく示さないか、示しても尾を引いた曖昧なバンドとなるため、定量的な検討はできなかった。 β サブユニットの活性についてのまとめの図を以下に示す(図3.2.10)。

3.2.11 α サブユニットの転写活性化ドメイン

PEBP2の転写因子としての重要なもう一つの側面である転写の活性化は、主に α サブユニットによって担われていることが既に示されている[Ogawa et al., 1993a]。また、欠損 $\alpha A1$ サブユニットによる解析の結果、転写活性化を担っているのはRunt domainのC末端側のプロリン、セリン、スレオニンに富む領域全体であることがわかった。この領域の欠損は、その程度が大きくなるほど転写活性化能が減少し、Runt domainだけでは転写活性化能はまったく失われた。 αB サブユニットについても同様の結果が得られている[Bae et al., 1993]。さらに αA サブユニットの様々な領域を分割して、転写因子Gal4のDNA結合ドメインに融合させたキメラ蛋白質を用いて、転写活性化ドメインを同定しようとしたが、この方法では分割されたどの領域にも転写活性化能は検出されなかった[Ogawa et al., 未発表]。これはPEBP2が通常の転写因子とは異なり、その転写活性化にはほかの因子との共同作用[Wotton et al., 1994, Hernandez-Munain et al., 1994]、あるいは特定のDNA構造が必要なためと考えられる[Giese et al., 1995]。これらについての詳細は考察中4.4.7、および4.4.8節の中で述べる。

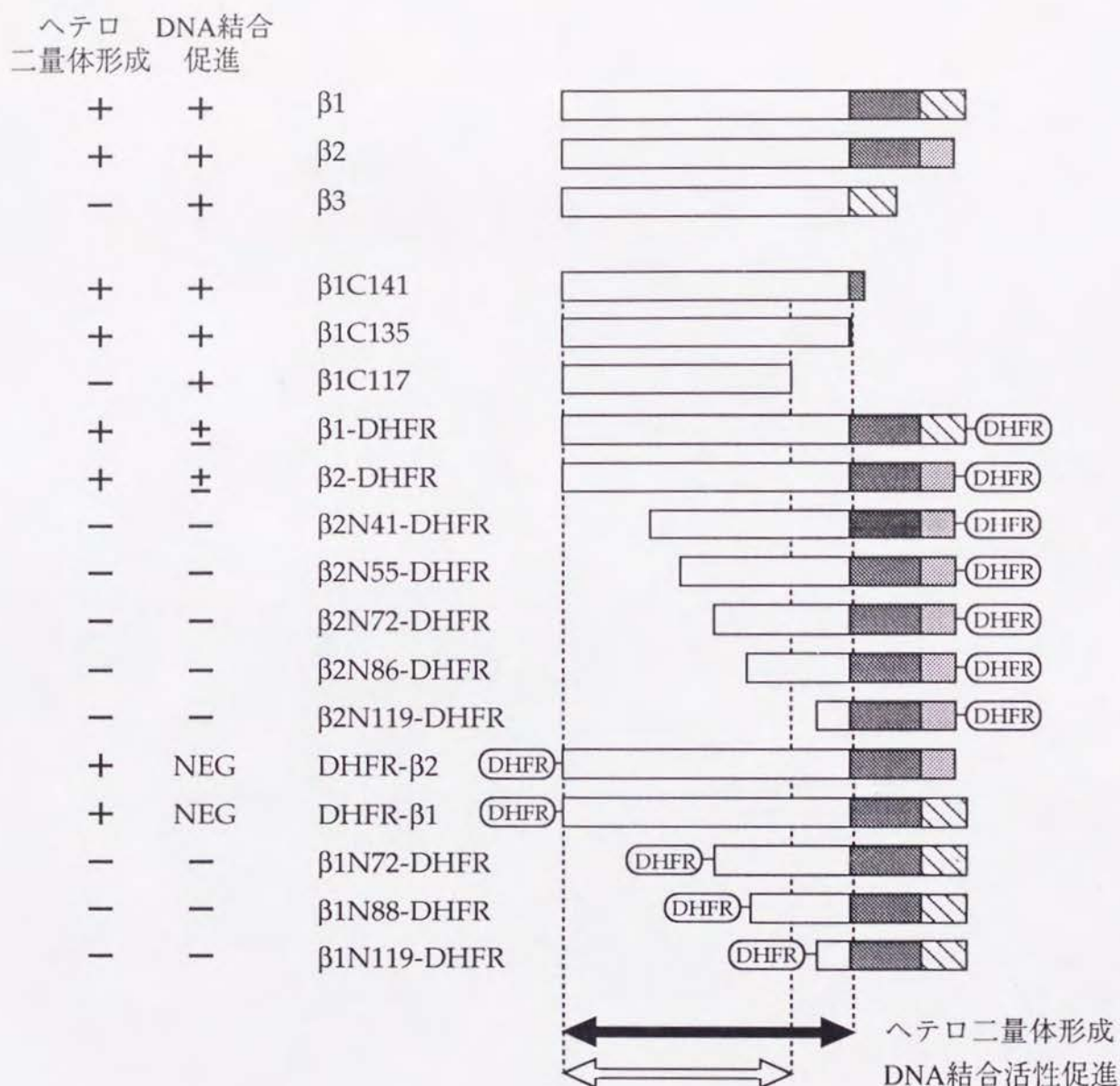


図3.2.10 PEBP2 β サブユニットの機能領域

解析に用いた β サブユニット組み換え体の構造を示す。同じ模様の部分は同一の配列であることを表わす。各変異体におけるヘテロ二量体形成能、DNA結合促進能の有無は、左の2つのカラムに+、-などの記号で示す。なお、 \pm はどちらとも判断できないものを示し、NEGは負の(抑制)効果を示す。

3.3 酸化還元によるRunt domainの活性調節

前節で述べたように還元剤DTTが α Aサブユニットの活性に大きな影響を与えることがわかった。この知見を受けてRunt domainのアミノ酸配列を改めて見直すと、 α A, B, Cサブユニットの間に保存された二つのシステイン残基が存在し、特にそのうちの一方は近傍に正の電荷を持つアミノ酸があることから、酸化還元に対して高い感受性をもつ可能性が示唆された[Snyder et al., 1981]。そこで酸化還元(Redox)制御によるRunt domainの活性調節について解析を進めた。

3.3.1 Runt domainにおける酸化還元(Redox)制御の存在確認

酸化剤としてジアミド、還元剤としてDTTを用いて、Runt domainの酸化還元状態を任意に変化させた場合に、その単量体、およびヘテロ二量体のDNA結合活性がどのように影響されるかを検討した。

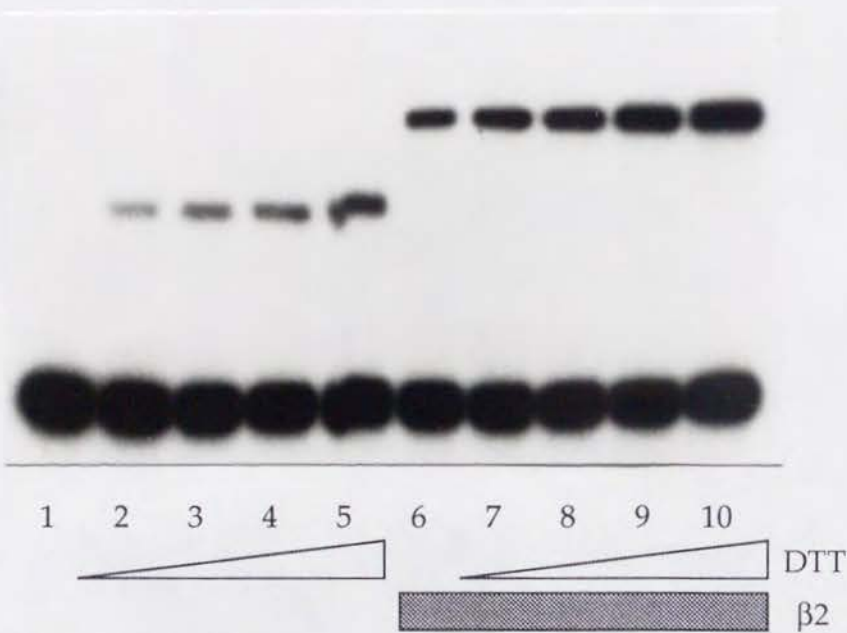
まず α N94C226(RD)単量体にジアミドを様々な濃度で作用させると、0.25 mMで95 %以上、2.5 mMで完全に失活した。次いで、一度失活したRDにDTT (100 mM)を加えると、活性は回復したばかりでなく、標準条件(1 mM DTT)で反応を行った場合よりも、2-3倍に上昇した(図3.3.1A)。この結果から、RDがDNA結合活性を発揮するためには、SH基が還元状態でなければならないことが明確になった。また、これまで α サブユニットの再活性化、保存、およびEMSA反応に用いる溶液には、一般的に使われている条件[Dignam et al., 1983]にならってDTTを1 mMしか加えていなかったが、それでは不十分なことがわかった。そこでDTT濃度への依存性を改めて検討し直したところ、驚くべきことに300 mMまで加えてもDNA結合活性はプラトーには達せず、増加する一方であり、この結果は再活性化後、そのままのサンプルを用いた場合にも、ジアミドによって酸化処理したサンプルを用いた場合にも、同様に観察された(図3.3.1B)。これ以上にDTT濃度を高めることは実際上困難なため、以後は一応十分な活性が得られる100 mMを標準として用いた。



図3.3.1A Runt domainの酸化による失活、および還元による再活性化

RDを用いて様々な濃度のジアミド存在下にEMSA反応を行った(レーン1-5および6-10につきそれぞれ順に、0, 0.025, 0.25, 2.5, 25 mM)。またレーン1-5はDTT無添加で、レーン6-10は100 mMのDTT共存下で反応を行った。

(A) Oxidized RD



(B) untreated RD

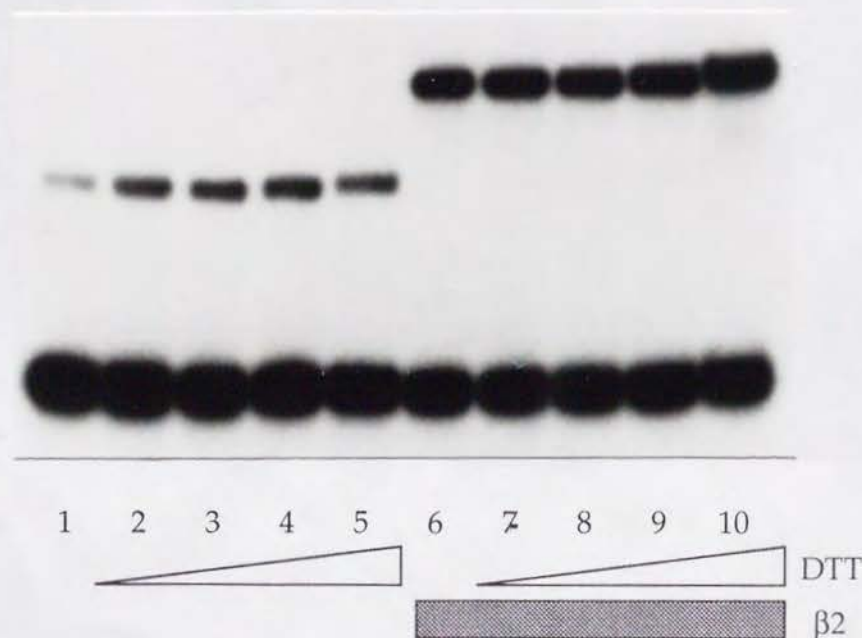
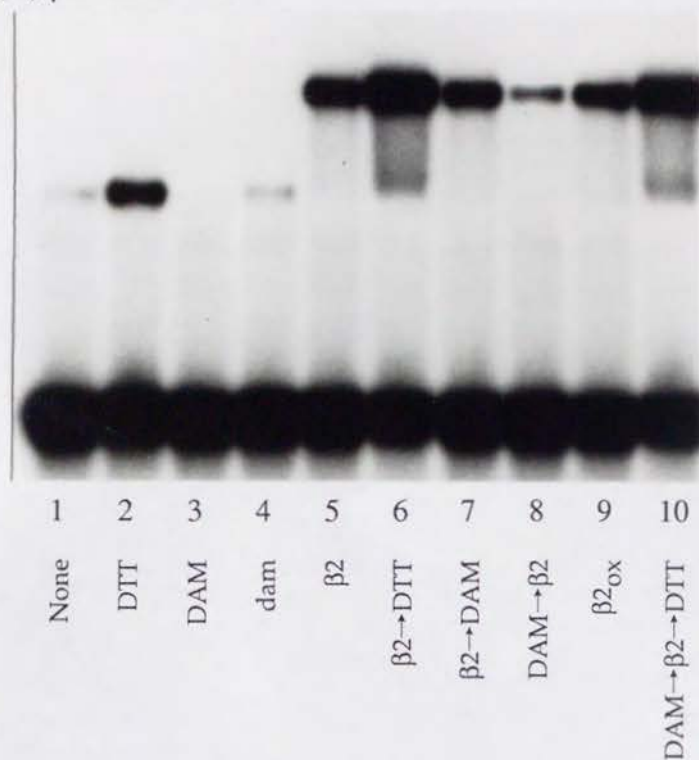


図3.3.1B Runt domainのDTT濃度依存性の活性上昇

ジアミドであらかじめ酸化処理したRD(A)および無処理のRD(B)を用いて種々の濃度のDTT存在下にEMSA解析を行った(レーン1-5およびレーン6-10につきそれぞれ順次、0, 10, 30, 100, 300 mM)。A、Bいずれもレーン1-5はRD単独での、レーン6-10は $\beta 2$ サブユニット共存下での活性を示す。

(A) $\beta 2$ subunit



(B) $\beta 3$ subunit



図3.3.1C Runt domainの酸化還元に対する β サブユニットの効果

DTT (100 mM)、ジアミド(DAM, 0.25 mM; dam, 25 μ M)、および β サブユニットをそれぞれ単独、あるいはいろいろな順序で組み合わせて用いることによって、これらがRDのDNA結合活性に及ぼす影響をEMSAによって解析した。各レーンの下に添加物の種類、および処理の順序を示す。レーン9の β_{ox} は、あらかじめ酸化処理した β サブユニットを添加したことを表わす。 β サブユニットとして(A)では $\beta 2$ を、(B)では $\beta 3$ をそれぞれ用いた。

一方、 β サブユニットとのヘテロ二量体の場合(図3.3.1C)、ジアミドを2.5 mM加えても、ほとんど活性の低下は観察されなかった(レーン7)。しかし、あらかじめジアミドで失活させたRDに β サブユニットだけを添加しても活性は戻らなかった(レーン8)。これに対して過剰のDTTを加えたところ活性は回復し、やはりもとの場合よりも上昇した(レーン10)。また、このときあらかじめジアミド処理した β サブユニットを用いた場合においても、ヘテロ二量体のバンドに影響はないことから(レーン9)、 β サブユニットは酸化にたいして抵抗性を持つことがわかった。これらの観察を総合すると、 β サブユニットはRDの酸化還元反応には直接関与しないが、活性に必要なSH基をマスクして、酸化剤の攻撃から保護する作用も持つものと考えられる。また、 $\beta 2$ サブユニットによる保護機能は、 $\beta 3$ サブユニットにおいても同様に観察され、EMSAでは観察できなかった $\beta 3$ サブユニットとRDの相互作用が、溶液中では存在していることが3.2.10節に続いてここでも示された。

3.3.2 DTTによるRunt domainの活性化と時間経過

前述のようにRDの完全な活性化には300 mM以上のDTTが必要なことがわかったが、DTTのSH還元力は低濃度でも非常に高いとされており、平衡論的な意味からは理解し難い結果である。その原因の一つとして、還元反応の速度常数が非常に小さいためではないかと考えられる。そこでDTTによる再活性化の時間経過を検討してみた。

あらかじめ失活させたRDに100 mMのDTTを添加すると β サブユニットの有無にかかわらず再活性化は意外に速く起こり5分以内にピークに達し、その後また減少に転じた。特に単量体の場合の減少は著しく、30分後には約1/3に、60分後には完全に失活してしまった。しかし、ヘテロ二量体の場合、失活は防がれピーク値が10分にシフトするとともに60分後にもピーク値の50 %以上の活性が維持され(図3.3.2)、 β サブユニットがこの局面においても強い保護作用を及ぼすことがわかった。

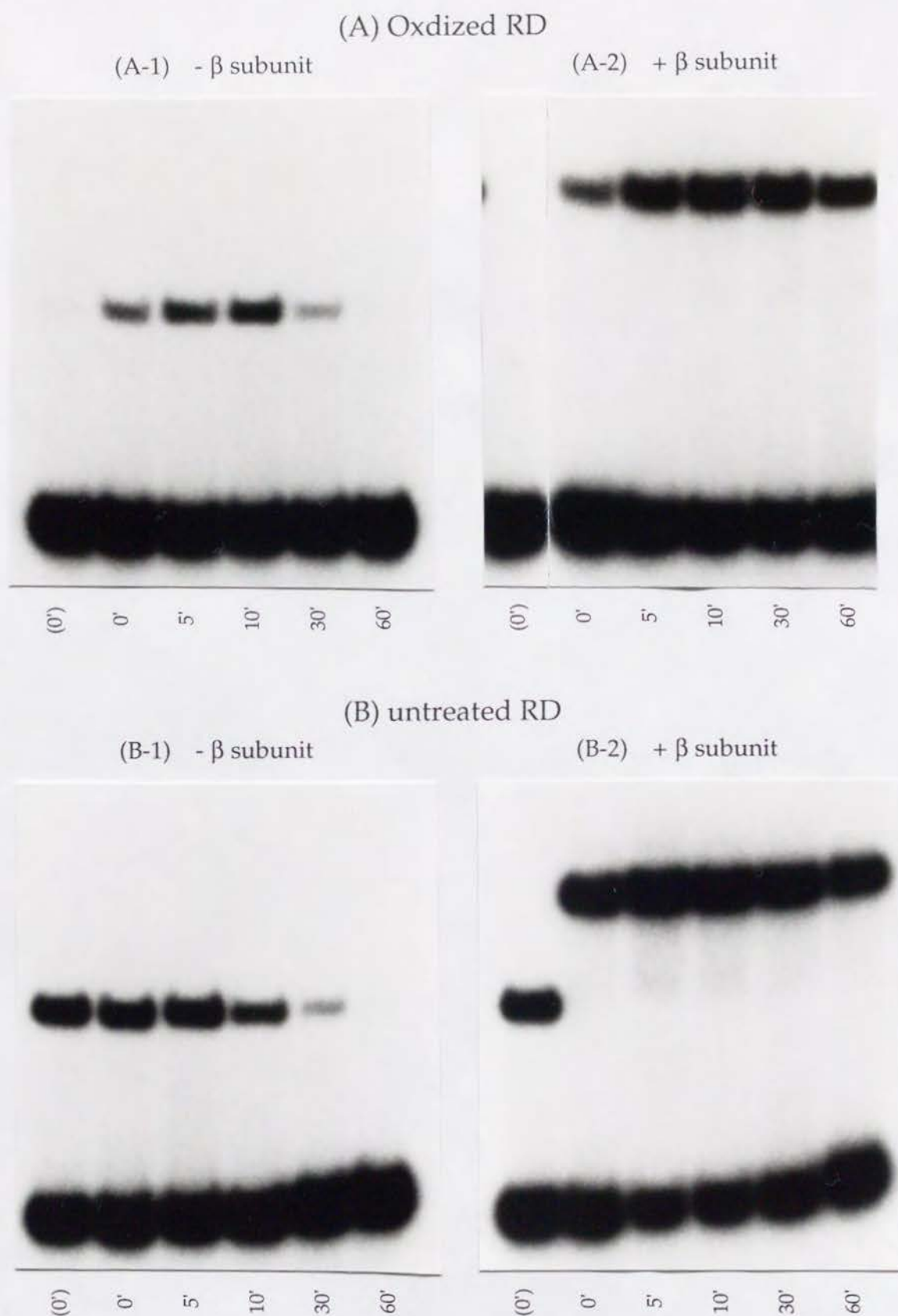


図3.3.2 DTTによるRunt domainの活性化とその時間経過

RDを含むEMSA反応液にDTT (100 mM)、および表示があるもの(A-2, B-2)については β サブユニットを添加した後、図の下に示したように0から60分まで経時的にサンプリングし、EMSA解析を行った。用いたRDは上段(A)ではあらかじめ酸化処理したものを、下段(B)では無処理のものをそれぞれ用いた。

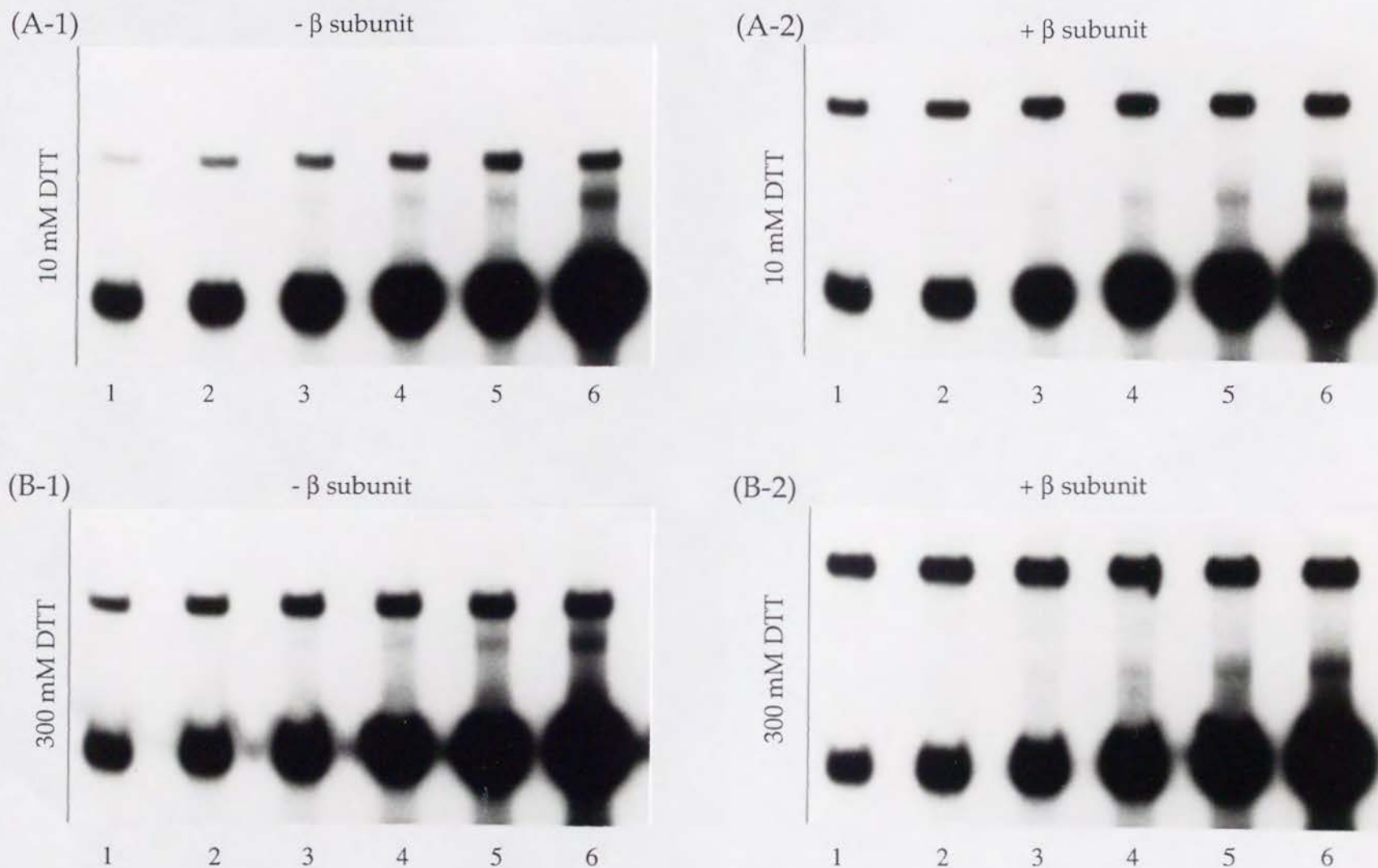


図3.3.3A 低濃度、および高濃度DTTにおけるRunt domainのDNA結合活性の定量的解析

あらかじめ2.5 mMジアミドによって酸化処理したRDに、10 mM (A-1, 2) もしくは300 mM (B-1, 2) のDTTを加えて25℃、10分再活性化を行なった。その際、A-2とB-2では β サブユニットを同時に加えた。これにDNAプローブを様々な濃度(レーン左から、1、2、4、8、16、32 nM)加えて、EMSA解析を行った。

3.3.3 β サブユニットのDNA結合促進効果の定量的再評価

前述の結果から、EMSA法を再現性良く正確に行うためには、DNA結合反応を開始してからゲルにのせ、電気泳動にかけるまでの時間が5 - 10分の範囲で一定になるようにコントロールする必要があることがわかった。また、 β サブユニットの見かけのDNA結合促進作用の中には、DNA結合の解離定数(K_d)を減少させる、すなわちDNA-蛋白質複合体の安定性を高める効果と、 α サブユニットの活性型構造への変換、および保護効果の二つの側面が含まれており、それらの相対的比重はRDの還元状態によって様々に変動するものと予測される。そこで10 mMと300 mMのDTT存在下で、RDの還元が中程度に進んだ状態と、ほぼ完全に進んだ状態を設定して、それぞれの状態での K_d と見かけの最大活性に対する β サブユニットの影響を、上述の条件を守りつつEMSA法により解析することにより再評価することを試みた(図3.3.3A)。

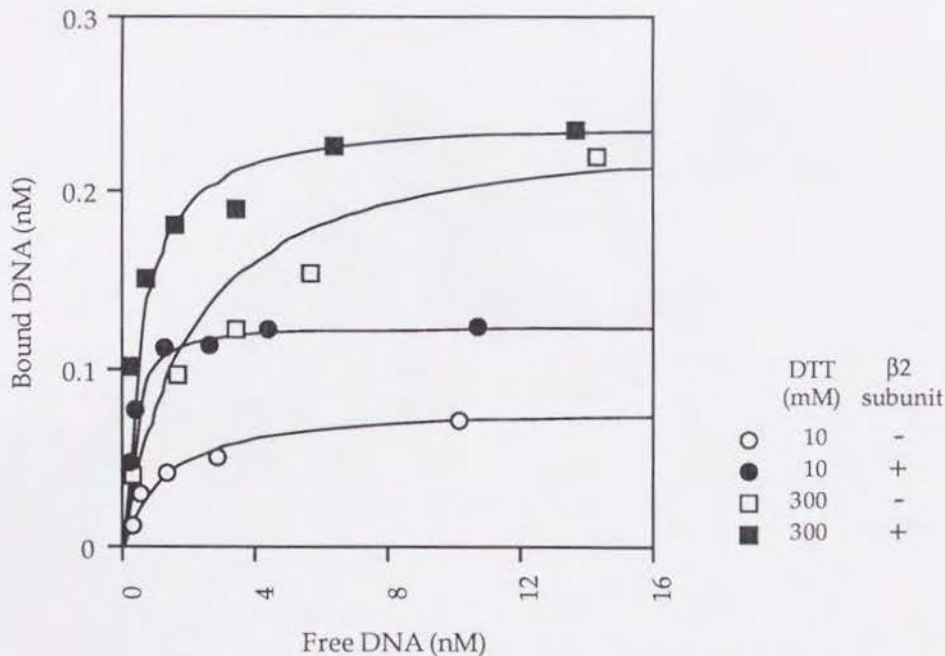


図3.3.3B β サブユニットによるRunt domainのDNA結合活性促進効果

α サブユニット(RD, 1反応あたり1 ng)の単独、および α - β ヘテロ二量体としてのDNA結合活性を、10 mMあるいは100 mMのDTT存在下に、DNA濃度を1 - 32 nMの範囲で振りながらEMSAによって測定した。グラフの横軸は遊離DNAの濃度を、縦軸は結合DNAの量をそれぞれ表わす。右にデータの表示に用いたシンボルと測定条件の関係を示した。

その結果、予想通りに300 mM DTTの条件では β サブユニットが存在しても最大活性は変化せず、 K_d のみが約1/6まで減少するのに対して、10 mM DTTの条件ではほぼ同程度の K_d の減少とともに最大活性の明らかな増加(1.6倍)が認められた(図3.3.3B)。

第四章 考察

本研究では、マウス転写因子PEBP2を構成するサブユニット α 、 β の機能ドメインの解析を行なった。これによって α サブユニットcDNAの産物は、単独でPEBP2認識配列に特異的に結合すること、および β サブユニットは α サブユニットとヘテロ二量体を形成することによって複合体全体のDNA結合活性を大きく上昇させることを示した。また、PEBP2 α サブユニットは、ショウジョウバエの分節化遺伝子runt、ヒト急性骨髄性白血病関連遺伝子AML1と極めて高い相同性を持つ128アミノ酸の領域を共有していることが明らかになり、これらは新しいDNA結合蛋白質ファミリーを作っていることが明らかになった。我々はこの領域をRunt domainと名付けた。Runt domainはその配列中に既知のDNA結合構造(ロイシンジッパー、Znフィンガー、ヘリックス-ターン-ヘリックス、ホメオドメインなど)を持たず、これらと比肩されるべき新しいクラスのDNA結合モチーフであることが示された。一方、 β サブユニットには、類似の蛋白質、あるいは既知の機能ドメインは見い出されていないが、これもまたヒトで類似の白血病の原因となることが示された。PEBP2は、初期胚細胞株F9の分化誘導にともなって出現し、また発癌遺伝子Ha-rasによって、分子的挙動が変化することなどの観察から、細胞の分化・増殖制御に、何らかの重要な関わりを持つものと予想されていたが、これらの事実によりそれがまさに裏付けられたといえる。

そこで α の相同領域(Runt domain)が担う機能を明らかにするために一連の α 欠損体を作成し、ゲルシフト、及び蛋白-蛋白親和性クロマトグラフィーによる解析を行った。この結果、 α のDNA結合能および β とのヘテロ二量体形成能は、ともにRunt domainに含まれることを示した。一方、 β についてもそのヘテロ二量体形成能は、N末端側135アミノ酸の領域に存在することを明らかにした。さらに引き続き、DNA-蛋白、蛋白-蛋白相互作用の解析を更に詳細に進めた結果、Runt domainが酸化還元調節を受けることが明らかになった。

他方その後、新たにこの因子の研究に参入してきたグループからの様々な報告が増え

つつある。我々の行った構造的解析の結果に加え、これらを踏まえて以下順次考察する。

4.1 α サブユニットのアミノ酸配列

α サブユニット中にはRunt domain以外にも、いくつかの特徴あるアミノ酸配列が見い出される。Runt domainについての詳細は以後の節に譲り、ここではこれ以外に見い出される配列上の特徴について述べる。

4.1.1 グルタミンクラスター

α AサブユニットのN末端近くには、グルタミン28残基の連続した領域が存在する。グルタミンの連続したモチーフは、ショウジョウバエの膜結合レセプター的一种である神経形成遺伝子Notchで最初に見いだされ、OPA配列と名付けられていた[Wharton et al., 1985]。この配列は、膜結合レセプターから核内因子まで、細胞の情報伝達に關与する多岐にわたる機能蛋白質に見いだされており、その後ショウジョウバエの遺伝子産物中で続々見つかった。ギャップ遺伝子*hunch back* [Tautz et al., 1987]、セグメントポラリティー遺伝子*engrailed* [Kuner et al., 1985]、ペアルール遺伝子*fushi-tarazu* [Laughon & Scott 1984]、ホメオティック遺伝子*Antennapedia* [Schneuwly et al., 1986]、*Deformed* [Regulski et al., 1985]、Ubx遺伝子群の腹節遺伝子*iab-2*、*iab7*遺伝子産物[Regulski et al., 1985]などがそれであるが、マウスにおいてもOPA配列を持つ一群のmRNA (Mopa)が、細胞の分化に伴って出現することが分かっている[Duboule et al., 1987]。4.1.3節に述べるようにOPA配列の増幅による遺伝病が引き起こされる例のあることから、この配列は何らかの制御機能を持つものと推測されているが、その具体的な機能は未だ明らかになっていない。

転写活性化因子においては、Jun、Sp1など数多くの因子が、転写活性化領域としてグルタミンに富む領域を持っていることが知られているが[Mitchell & Tjian 1989]、このように切れ目なく連続している場合は、この領域の機能が必ずしも転写活性化とは直結しないと考えられている[Seipel et al., 1992, Gerber et al., 1994]。このモチーフを持つ重要な

転写制御因子として、TATA結合蛋白質(TBP)がある[Goodrich et al., 1994]。この因子は基本転写因子の中でも第一番目にDNAに結合し、その他の因子、およびRNAポリメラーゼの集合の鍵を握っている。またこの因子は、転写活性化因子とポリメラーゼとの間の情報を橋渡しする働きを担っている。グルタミンクラスターは脊椎動物とショウジョウバエのTBPのN末端側に存在しており、ヒトでは41個、マウスでは16個、アフリカツメガエルでは10個、ショウジョウバエには18個のグルタミンが連なった形をしている。しかしその一方、線虫、シロイヌナズナ、小麦、分裂酵母、出芽酵母、などのTBPにはこのクラスターは存在していない。したがって、その機能は普遍的なものとは考えられないが、おそらく節足動物や脊椎動物の進化に関連して、何らかの意味があるのではないかとと思われる。

4.1.2 アラニンクラスター

さらに、 α AサブユニットのN末端付近にはOPA配列に続いて、アラニン18残基の連続した領域が存在する。アラニンクラスターについての知見は、OPA配列のそれよりもさらに少ないが、やはりショウジョウバエのギャップ遺伝子 *Kruppel* 遺伝子産物で次のような報告がなされている。*Kruppel* はZnフィンガーを持つDNA結合蛋白質で、遺伝学的解析によれば、*knirps* を活性化し、*seven-skipped*、*hunch back* を抑制することが知られている。LichitらはヒトHeLa細胞、サルCV-1細胞において、様々な欠損 *Kruppel* を作り、それを用いた機能解析から、N末端付近にあるアラニンに富む配列が転写抑制領域であろうと結論した[Lichit et al., 1990]。これをさらに支持するものとして、アラニンに富む領域は、やはり支配下にある遺伝子の発現を抑制する能力を持つ *seven-skipped*、*engrailed* にも存在していることが示されている[Jaynes & O'Farrell 1988, Han et al., 1989, Biggin & Tjian 1989]。しかし、Sauerらは、ショウジョウバエのSchneider細胞を用いて実験を行ない、ある濃度で *Kruppel* が存在しているとき、N末端領域はむしろ活性化領域として働くという結果を得ており[Sauer et al., 1991]、細胞のタイプによってこの領域が活性化、抑制のいずれにも働くのではないかと報告している。

4.1.3 トリプレットリピート

上にあげた二つのクラスターは、それぞれCAG、CGGのトリプレットリピートによってコードされており、ヒトではこのような繰り返し配列の異常な増幅が様々な深刻な病気を引き起こす例が発見されている[Caskey et al., 1992, Morell et al., 1993]。

ステロイド受容体型の転写因子であるアンドロゲンレセプター(AR)遺伝子中には正常で約10-20個のCAGリピートが存在しているが、ケネディー病として知られる伴性劣勢の遺伝病、球脊髄筋萎縮症(spinobulbar muscular atrophy)では、このリピート約30-50に増加する。このCAGリピートはAR遺伝子の翻訳領域中にありグルタミンがコードされる。AR遺伝子産物はリピートの増加によってその活性を失い、その結果、運動神経の異常や、雄性発生に異常をきたすことがわかっている[La Spada et al., 1991]。また、精神遅延を起こす伴性劣勢の遺伝病脆弱X症候群(fragile X syndrome)においては、FMR-1遺伝子はその原因遺伝子として明らかになっており、正常遺伝子の場合、その5'非翻訳領域中にCGGリピートが5-50個あり、これが200-1000以上に増幅してしまった場合に発症する。[Fu et al., 1991] FMR-1遺伝子の機能はわかっていないが、リピートの増幅によりFMR-1遺伝子の上流に大きなCpGアイランドが形成され、その結果シトシンのメチル化が起こるため、遺伝子発現が強く抑制されるために発症することが示されている[Verheij et al., 1993]。常染色体優勢の遺伝病、筋緊張性ジストロフィー(myotonic dystrophy)の原因遺伝子はmyotoninリン酸化酵素であることが明らかになっている。正常遺伝子の3'非翻訳領域には5-30個のCTGリピートがあり、これが100-3000個に増幅した場合に発症する[Fu et al., 1992]。ハンチントン舞踏病(Huntington's disease)も遺伝病であり、その原因遺伝子は、ハンチントン遺伝子と呼ばれ、正常遺伝子では翻訳領域内に10-30個のCAGリピートがあり、この増幅(40-60個)が直接の原因となって発症することが明らかになっている[H. D. C. R. Group 1993]。

これらの病気はすべて遺伝病であるが、このリピート数の遺伝は古典的なメンデルの法則に従わず、親から子へ受け継がれる場合に突然急激に増加、まれには減少する。ど

の遺伝子においてもリピートの数が増えるにしたがって病気の程度も重くなるが、正常と病気の間(発病しない)のリピート数をもつ人もあり、このような中間のリピートを持つ人から、子に受け継がれる場合にとくに大きなリピートの増幅が起こる。また、増幅の程度が親の性別によって異なることが報告されており、ハンチントン舞踏病の場合は父親の、脆弱X症候群の場合は母親の遺伝子が、子に伝わる場合に急激なリピートの増加が起こることが分かっている。このようなトリプレットリピートを持つ遺伝子は他の生物種にも多く見い出されているが、他の生物ではこのような急激な増幅は見つかっておらず、今までのところヒトに特有の現象であろうと報告されている。増幅のメカニズムは全くわかっておらず、ただDNA複製やDNA修復の異常などに起因するであろうと推測されているに過ぎない。また、このようなリピートは、進化的に保存されていることから、何らかの機能を持つものと考えられるが、その正常な場合の働き、また増幅によるその変化についてもまったく明らかになっていない。まだ発見されてはいないが、 α Aサブユニットでも同様な遺伝病が起こる可能性が考えられ、今後注目して行く必要があるだろう。

4.1.4 ATP結合モチーフ

Runt domain中の特に強く保存された領域内には、ATP結合モチーフのコンセンサス配列が存在している[Walker et al. 1982]。ATP結合モチーフは(GxxxxGKS/T)で表され、Runt domain中ではGrsgGKSが、このコンセンサス配列に相当する。しかし、Runt ファミリー蛋白質のATP結合活性を証明する試みは成功しておらず、現在この可能性は否定されている。この領域には正の電荷を持つアミノ酸が多く含まれることから、むしろDNAとの結合に寄与している可能性が考えられる。しかし、この配列は同時にグリシンに富んでいることから、一般にDNAとの直接の相互作用を行うとされている α ヘリックス、 β シートなどの構造をとりにくく、この領域にある正の電荷が全体でDNAとの結合を補助する可能性が考えられる。

4.1.5 PEST配列

PEST配列は、細胞内でのターンオーバーが非常に短い蛋白質、すなわち分解を受けやすい蛋白質中で見い出されたアミノ酸配列上の特徴で、二つの塩基性アミノ酸(アルギニン、リジン、ヒスチジン)の間にはさまれた形でPE/DS/T(プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、スレオニン)に富む10残基以上の親水性のアミノ酸が続く配列パターンを指す[Rogers et al., 1986]。PEST配列はまた、様々な転写因子の転写活性化領域中に多く見い出され、その代表例としてE1A、*c-myc*、*c-fos*などがあげられる。

コンピューターによりPEST領域の検索を行なうと、 α サブユニットをはじめとするRuntファミリー遺伝子にはすべてC末端領域にこの配列が存在していた。このことからこれらは代謝回転の早い蛋白質である可能性が考えられる。また、この領域は転写活性化に重要な役割を担っていることが、 α A、および α Bサブユニットにおいて示されいる(詳細は後述)。

4.1.6 VWRPY配列

Runtファミリーに属する遺伝子群は、すべてC末端に完全に一致した5アミノ酸(VWRPY)を共有している。興味深いことに、*hairy*遺伝子産物も類似の配列(PWRPW)をC末端に持つ。ショウジョウバエで互いに抑制的に働く因子runtと*hairy*に共通してこの配列が存在することから、何らかの因子がこれらの働きをVWRPY配列を通じて制御している可能性が考えられている。これに関連して、*hairy*のPWRPW配列と相互作用する因子としてgrouchoが酵母を用いたtwo-hybrid法によって同定された[Paroush et al., 1994]。grouchoは蛋白質間相互作用に関与するWD40繰り返しモチーフ[van der Voorn & Ploegh 1992]を持つ因子で、ショウジョウバエの胚発生の過程において分節化、性決定および神経系の分化に関与する。このことから、runtと*hairy*がVWRPY/W配列を通じてgrouchoと相互作用し、お互いに制御しあう可能性が十分に考えられる。また、ラットの*hairy*関連蛋白質(HES因子)にもこれと類似な配列(WRPR)が存在しており、ショウジョウバエにおけるrunt-*hairy*間の機能的相互作用が、哺乳類においてもPEBP2 α サブユニット-HES因

子の形で保存されていることを示唆しており興味深い[Sasaki et al., 1992]。このような観点からPEBP2 α サブユニットのVWRPY配列の欠損解析を行ったが、マウスP19細胞を用いた発現実験では、TCR β エンハンサーを介する転写活性化[Ogawa et al.未発表]、および細胞内局在性[Lu et al., 1995]には影響が観察されなかった。しかし、この点は宿主細胞とレポータープラスミドの構造などの組み合わせを変えて、さらに検討を行う必要がある。

4.2 PEBP2 α 、 β サブユニットの機能領域

4.2.1 α サブユニットの機能領域

α Aサブユニットの欠損解析の結果から、DNA結合能は113番目から226番目のアミノ酸の領域が、 β とのヘテロダイマー形成能は94番目から216番目のアミノ酸の領域が担っていることを示した。この件に関して我々はRunt familyに属する他のメンバーについても機能ドメイン解析を行っており[Kagoshima et al., 1993]、今回のデータにこれらを併せて考えると最小機能領域はさらにしぼられる。

DNA結合領域：PEBP2 α Bのサブタイプの一つである α B2、およびAML1の染色体転座によるキメラ産物であるAML1-MTG8、AML1-EVI-1では、Runt domainのすぐC末端側の配列は α A/ α B1/ α Cとは大きく異なるが、これらはすべて強いDNA結合活性を持っている。したがって、DNA結合活性はRunt domainのC末端(α AではC220に相当)まであれば、十分であると結論される。一方、N末端側の境界については、今回用いたヒスチジンタグ付きの α N113は弱いながらDNA結合活性を示したが、*in vitro*転写-翻訳系を用いて産生したタグのない形の α N113は活性が検出されなかった。タグの部分がこのタイプの欠損体のN末端部分の高次構造に、何らかの形で好影響を与えたためにこのような差が生じたものと推測される。この結果からN113はDNA結合に必要な最小領域の境界に相当すると考えても良いであろう。

ヘテロ二量体形成領域：GST融合型のAML1欠損変異体を用いた解析から、AML1では

59 - 190アミノ酸の領域が存在すれば、この β サブユニットとの結合活性が保たれることが示されている。これを α Aに当てはめれば102 - 232アミノ酸の領域に相当することから、ヘテロ二量体形成のN末端側の境界は102番目ということになる。

以上の考察から、 α AサブユニットのDNA結合能は113から220のアミノ酸の領域に、ヘテロ二量体形成能は102から216のアミノ酸の領域に局在すると結論できる(図4.2.1)。またこれによって、Runt domainは特異的DNA結合能および β サブユニットとのヘテロ二量体形成能を合わせ持つ最小機能単位であることが示され、このドメインが、ロイシンジッパー、Znフィンガーなどに比肩する新規の構造モチーフとして位置付けられるに至った。さらに、それまで分子的機能が長らく不明であった *runt* および AML1 が、転写因子であり、 β サブユニットと対になって機能することが初めて明らかになり、これらの因子の分子的研究の展望が開けた。Runt domainが比較的大きく、また進化的に極めて高度に

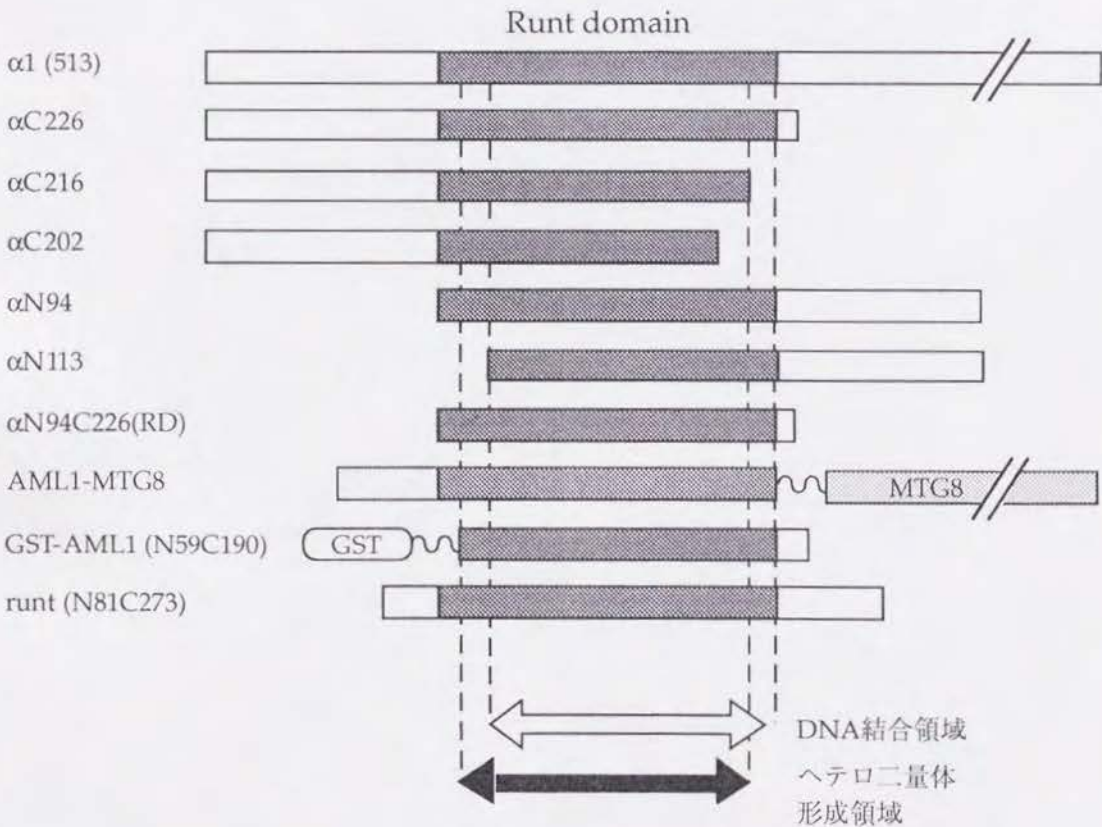


図4.2.1 PEBP2 α Aサブユニットの機能領域

保存されているのは上に述べた二つの機能が、ともにこの領域に集約されているためと考えられる。

4.2.2 β サブユニットの機能領域

すでに $\beta 1$ 、 $\beta 2$ サブユニット、さらに $\beta 1C14I$ 変異体は α サブユニットとのヘテロ二量体形成能を持ち、 $\beta 3$ サブユニットはこの活性を持たないことが報告されていたが [Ogawa et al., 1993b]、今回さらに一連の欠損サブユニットのゲルシフト解析によって、 β サブユニットのヘテロ二量体形成能はN末端側の135アミノ酸の領域に担われていることを示した。ヘテロ二量体形成能を持つサブユニットおよび欠損体と、持たない $\beta 3$ サブユニットとの間の決定的な違いは、133番目に続く2残基が前者ではQEであるのに対し、後者ではそれがARに置換されている。そこでこのQEが存在がこの機能に重要であるか、またはARが負の作用を及ぼしているのかのどちらかであろうと考えられる(図4.4.2、および図4.3.1B参照)。

また、 α サブユニットの結合活性を促進する性質は、ヘテロ二量体形成がEMSAによって検出可能な $\beta 1$ 、 $\beta 2$ サブユニット、および $\beta 1C14I$ 、 $\beta 1C135$ サブユニットだけでなく、それが検出できない $\beta 3$ 、 $\beta 1C117$ サブユニットにも存在していた。この結果は、 $\beta 3$ 、 $\beta 1C117$ サブユニットも、 α サブユニットと何らかの相互作用を行う能力を持っており、その結果DNA結合活性を上昇させるような構造変換を引き起こすことを示唆する。したがって溶液中では α - β -DNA複合体が形成されていると考えられるが、それが十分に強固でないために、EMSAゲルに侵入できずに β サブユニットが解離してしまうものと推測される。

最近、 β サブユニットのショウジョウバエホモログBrother、Big brotherがクローニングされた[Golling et al., 1995]。これらの蛋白質はcDNAクローンの解析によって、 β サブユニットと高い相同性領域を持つことが示された(図4.4.2)。ただし、これらの蛋白質のN末端にはマウスの β サブユニットよりも40-50残基以上伸びている可能性が示唆されている。相同性領域は β サブユニットのN末端のメチオニン残基の位置から始まり、

133番目のアミノ酸の位置まで続く。 β サブユニットにおいては、このアミノ酸のすぐ後がイントロンの挿入位置になっているため、ショウジョウバエにおいても同様にこの位置でスプライシングが起こる可能性が考えられる。これらの知見によって、欠損解析によって同定された機能領域(N末端側135アミノ酸の領域)は、進化的に高度に保存された領域とほぼ完全に一致していることが示され、この同定の妥当性が裏付けられた。この領域の中程に十数残基にわたって、3つの β サブユニットクローンとショウジョウバ

		1	10
BETA1		MPRVVPDQRS	
BETA2		MPRVVPDQRS	
BETA3		MPRVVPDQRS	
BROTHER	LYLSENTVITLDMHHHQNLGDAVAAAALNGMIPPYEAMAMYEQPKPRFIFKMPRVVPDQRS		
BIG_BROTHER	HEGDES RKPVKMMNEAALSNMIPYDTIGLYEQPKKRFIFKMPRVVPQKS		
	20 30 40 50 60 70		
BETA1	KFENEFFRKLRSRECEIKYTGFRDRPHEERQTRFQACRDGRSEIAFVATGTNLSLQFFP		
BETA2	KFENEFFRKLRSRECEIKYTGFRDRPHEERQTRFQACRDGRSEIAFVATGTNLSLQFFP		
BETA3	KFENEFFRKLRSRECEIKYTGFRDRPHEERQTRFQACRDGRSEIAFVATGTNLSLQFFP		
BROTHER	KFDSDELFRRLSRESEVRYTGYRERAMEERRMRFVNDCKRGYAEISMVASGTNLQLYFNA		
BIG_BROTHER	KFESVELFRRLSRESEVRYTGYRERSIEERQVRFMNGCREGHTASVVASGTNLQLVFNA		
	80 90 100 110 120 130		
BETA1	ASWQGEQRQTPSREYVDLEREAGKVYLKAPMILNGVCVIWKGWIDLHRLDGMGCLEFDEE		
BETA2	ASWQGEQRQTPSREYVDLEREAGKVYLKAPMILNGVCVIWKGWIDLHRLDGMGCLEFDEE		
BETA3	ASWQGEQRQTPSREYVDLEREAGKVYLKAPMILNGVCVIWKGWIDLHRLDGMGCLEFDEE		
BROTHER	NHNPYAQEQD-----CDFERERGVHLRSSFIMNGVCVRFRGWVDLDRLDGAACLEFDEQ		
BIG_BROTHER	NQNPYLHDKE-----CDFDKEHGKVKHISYFIMNGVCVRFRGWIDLDRLDGVGCLEYDER		
	140 150 160 170 180		
BETA1	RAQQEDALAQQAFEEARRRTREFEDRDRSHREEMEARQQDPSPGSN--LGGGDDLKLR		
BETA2	RAQQEDALAQQAFEEARRRTREFEDRDRS-----HREEMEVVRSQL--LAVTGKKTARP		
BETA3	RAQ-----ARRQQDPSPGSN--LGGGDDLKLR		
BROTHER	RAQQEDAQLQEIQSYNQRMAE---SRRIYHTPQTTPEDHHHRGGPS--LPRGPMGW		
BIG_BROTHER	RAMHEDAILRDQIDRYNQRLREFEDTKRAYRDNRRQDEMEAVRRGVASGGIGVGASMWRR		

図4.4.2 β サブユニットファミリー蛋白質のアミノ酸配列比較

図中の数字は、 β 1サブユニットでのアミノ酸残基の番号

エの二つの遺伝子群の間で保存性の低い領域が存在している (β 1サブユニットでは67-86アミノ酸の領域、第三エクソンの一部)。この領域は、それぞれの種内のホモログ間では良く保存されていることから、種に固有な因子との相互作用を担っている可能性が考えられる。また、 β サブユニットは、ヒトの16番染色体の転座によるM4Eoタイプ急性骨髄性白血病の発症に強く関連していることが報告され、この転座によって生じた異常なヒト β サブユニットが、発症の原因となることが示された[Liu et al., 1993]。この場合、 β サブユニットの165番目のアミノ酸よりN末端側の配列と、ミオシン重鎖遺伝子産物MYH11との融合が起こるが、この時の β サブユニット部分はヘテロ二量体形成領域を保持しており、実際にこのキメラ蛋白質が α サブユニットと結合することも確かめられている[Hajra et al., 1995]。さらにまた、NIH3T3の形質転換には、PEBP2 β サブユニットの α サブユニットとの相互作用ドメインと、ミオシン重鎖の多量体繊維形成ドメインの両方が必要であることが示されている[Hajra et al., 1995]。

DHFRをN末端に融合した形の β サブユニットは、ゲルシフト解析によって α サブユニットのDNA結合活性を阻害することが示された。この結果から、この変異体を細胞に導入し、大量に発現させることによって、DNA結合活性を持つ α サブユニットを失わせることができるドミナントネガティブな働きを持つ変異体として用いることができる可能性が考えられる。これによって α サブユニットのDNA結合を介したエンハンサー活性が失われると想像され、この変異体を用いて α サブユニットの細胞の分化、癌化への関与を検討することができると期待される。

4.2.3 Runt domainの酸化還元調節

3.3節の実験から、Runt domain (RD)のDNA結合活性は酸化剤ジアミドの濃度に依存して減少し、0.25 mMの濃度でその活性はほぼ失われることが示された。酸化によるRDの不活化は、システイン残基のチオール基(-SH基)の酸化によって起こるものと考えられる。この残基の酸化は一般に、可逆的な分子内および分子間のジスルフィド結合(R-S-S-R)の段階に始まり、次亜硫酸(R-SOH)、亜硫酸(R-SO₂H)の各段階を経由して、つ

いには非可逆的な酸化段階である硫酸($R-SO_3H$)へと進行するが、ジアミドによる酸化は、第一の段階にとどまるものと考えられている。

一方、還元剤DTTの添加によってRDのDNA結合活性はその濃度に依存して著しく上昇し、最終濃度300 mMのDTTを加えた場合にもプラトーには達しなかった。このようにRDのDTT要求性は異常に高く、通常の転写因子の結合の場合よりも一桁以上も高い。DTTの-SH基に対する還元力は非常に強力であると考えられるので、アミノ酸側鎖の-SH基の還元になぜこれほどの高濃度DTTが必要なのか一見不思議に思われる。しかし逆にこの高いDTT依存性から、RDの活性を制御しているシステイン残基は非常に酸化されやすい状態にあると推察され、それゆえにかえって細胞内の酸化還元環境に対して敏感な応答が可能になるものと考えられる。また β サブユニット、還元因子などの調節蛋白質が存在しない場合、このシステイン残基は不活性な状態にあり、これらが関与することによって初めてRDのDNA結合の活性化が起こるものと考えられる。

図3.3.2の実験から、RDの活性を制御するシステイン残基の還元は秒単位で速やかに開始され、5 - 10分の時点で最も増強されることが示された。またこの時点以降はRDの活性は時間経過とともに減少して行くことが示された。この失活は大過剰のDTT存在下でも進行することから、可逆的な再酸化によるものとは考えにくく、ヒドロキシラジカルなどによる高レベルの酸化、ペプチド鎖そのものの変性、あるいは器壁への吸着など、何らかの不可逆的なプロセスが関与するものと推測される。またこの不活化はヘテロ二量体の場合はかなり抑えられ、この局面においても β サブユニットの保護効果が示された。またこの結果から、3.2.6項の定量的解析において指摘した、なぜ α サブユニット単独での活性測定が振れやすいのか、という疑問に初めて説明がついた。これまでは1回のEMSA測定ごとに、数本から数十本の反応液を調製し始めてから、ゲルにのせるまで30分以上かかっており、また一本ごとに、また実験ごとに経過時間が異なっていた。この間に失活が急速に進行していたために、活性測定時の結果が大きくふれる結果となっていたことがわかった。

環境の変化に応答する機構としての酸化還元調節そのものの存在は四十数年前から知

られている[Barron 1951]。この調節機構は原核生物から高等真核生物にいたるまで存在していると考えられ、生物の生存にとって基本的な、かつ重要な機構であると考えられる。しかし、実際に生体内においてこの機構が機能していることを示した例はまだ多くない。大腸菌においては酸化還元調節は、酸化ストレス応答に対する転写因子OxyR [Christman et al., 1985]、およびSoxS [Greenberg et al., 1990]によってなされている。これらの因子は酸化的ストレス物質、ヒドロキシラジカル、一酸化窒素ラジカルなどの存在に非常に敏感に応答し、これに対抗するため酸素ラジカルディスムターゼなどの遺伝子群の発現を誘導する転写活性化因子として働く。OxyR遺伝子産物のC末端側には活性の調節に重要なシステイン残基があり、この残基の酸化によってOxyRのDNA結合配列の特異性が変化することが示されている。またこの残基をセリンに置換した場合、OxyRは酸化、還元状態によらず常に活性形をとるようになる[Kullik et al., 1995]。SoxS遺伝子産物の機能は、[2Fe-2S]鉄イオンクラスターを構成する2つのシステイン残基によって調節されており、この因子のクラスターが酸化された状態([2Fe-2S]²⁺)で転写活性化能を持つようになる[Wu et al., 1995]。一方、真核生物においては、細胞内の制御機構に実際にin vivoで酸化還元調節が関わっているかどうか、厳密な意味では確立されていないが、少なくとも以下にあげた転写因子においては、この制御機構の存在を支持する状況証拠があげられている。NF-κBのDNA結合活性は、還元因子ADF/TRXの作用によって上昇し、細胞内でのこの因子の強制発現によって転写の活性化が起こる[Matthews et al., 1992]。またN-アセチル-Lシステインの添加によって、細胞内のチオール化合物の濃度を高めると、NF-κBの活性化が抑制されることが報告されている[Staal et al., 1990]。また、c-Fosでのシステイン-セリン置換はDNA結合活性を上昇させるだけでなく、この変異型Fosの形質転換によるトリ胚繊維芽細胞の軟寒天培地中でのコロニー形成能を大きく上昇させる[Okuno et al., 1993]。さらにc-Junの活性型変異体v-Junの酸化還元調節を担うシステイン残基は、セリン残基に置換されている[Bohmann et al., 1987]。またこの位置のシステイン-セリン置換は核移行にも影響することが示されている[Chida & Vogt 1992]。真核生物では、ヒドロキシラジカルは紫外線、放射線によって生じる以外にも、サイトカイン

によってむしろ積極的に産生され、これ自体がシグナルとなっている可能性が示唆されている。また直接検出されてはいないが、酸化還元調節はT細胞の活性化やリンパ球の細胞死にも関与している可能性も考えられている。

酸化還元調節の存在は、本因子以外にも多くの転写因子について示されており、代表的なものだけでもAP-1 [Abate et al., 1990a, Ng et al., 1993]、NF- κ B [Tredano & Leonard 1991, Matthews et al., 1992, Tredano et al., 1993]、Myb [Grasser et al., 1992, Guehmann et al., 1992, Myrest et al., 1993]、Ets [Wasylyk & Wasylyk 1993]などがあげられる。AP-1の酸化還元調節は、最初これを構成している原癌遺伝子c-Fos、およびc-JunのDNA結合機能についての解析を通じて浮かび上がった[Abate et al., 1990b]。この因子はin vitro発現系によって作った場合、そのままで十分な結合活性を持つが、大腸菌から精製した場合は弱い活性しか持たず、10 mM DTTを添加することによって始めて強い結合活性を示すようになる。また、AP-1のDNA結合はDTTとともに、蛋白質保護剤として牛血清アルブミン(BSA)や界面活性剤NP-40を加えることによってさらに増強される。こうした検討の過程で、Curranらは核抽出液中にAP-1のDNA結合活性を強力に促進する蛋白質因子が存在することに気づき、HeLa細胞の核抽出液から酸化還元調節因子Ref-1を精製し、さらにそのcDNAをクローニングすることに成功した[Xanthoudakis & Curran 1992, Xanthoudakis et al., 1992, Xanthoudakis et al., 1994]。RDのDNA結合活性は、DTTで大きく上昇すること、BSAなどの保護因子が存在しないと失活してしまうことなど、AP-1の場合と類似の特徴がある。これに加えて、RD中にある124番目のシステインをセリンに置換した変異体がAP-1の場合と同様に活性の著しい上昇をもたらすこと、また酸化還元因子Ref-1が非常に強い促進効果を示したことから、RDの制御機構はAP-1の形に近いものと考えられる[Akamatsu et al., 未発表]。

4.2.4 α 、 β サブユニットの相互作用

転写因子の活性は様々な段階によって調節されているが、中でも重要な一つの調節機構は複合体形成の段階である。真核生物の場合、これまでFos / Jun [Rauscher III et al.,

1988]、Myc / Max [Blackwood & Eisenmann 1991]などの構造的、機能的に類縁のもの同士がヘテロ二量体を形成することによって、お互いの機能を修飾する例は数多く報告されているが、我々の得たPEBP2 α 、 β サブユニットのように、お互いの間に相同性がなく、またそれぞれの持つ機能も異なっている例は少ない。このような形で複合体を形成する転写因子としては現在、GA配列結合因子(GABP) [La Marco et al., 1991, Thompson et al., 1991]、テロメア結合因子[Fang et al., 1993]が、知られている。GABPはプリン塩基に富む二本鎖のDNA配列(CGGAAR)に結合し、テロメア結合因子は繊毛虫類*Oxytricha*のテロメア配列、すなわち一本鎖DNAの(T₄G₄)₂配列に結合する。これらの因子はPEBP2と同様に直接DNA結合に与る α サブユニットと、単独ではDNAに結合できないが、これとヘテロ二量体を形成することによってその結合活性を上昇させる β サブユニットからなる。GABP α サブユニットは、DNA結合モチーフの一つEts domainをC末端付近に持ち、この領域が特異的DNA結合能と同時に β サブユニットとの二量体形成能を担う。多くの転写因子においては、複数の機能はそれぞれ分離できる別々の領域によって担われているが、このように一つの領域がDNA結合能と二量体形成能の二つの機能を持つ例は、Runt domain、およびこのEts domainの他にはまだ知られておらず、興味深い点であるが、この両者の間には配列上、および構造上の相同性はまったく存在していない。一方のGABP β サブユニットは単独ではDNAへは結合できないが、GABP α サブユニットとヘテロダイマーを形成することによってさらに安定な複合体を形成する。GABPでは β サブユニットの添加によって単量体の場合よりもより広いフットプリントパターンが得られ、GABP β サブユニット自身もDNAと相互作用できるようになることを示したが、一方、PEBP2のヘテロ二量体のフットプリントパターンは単量体の場合と同じであり、PEBP2 β サブユニットはDNAとの相互作用は行わないことが示されている[Kamachi et al., 1990]。GABP α サブユニット単独の場合、DNAとの結合は10秒以内に90%以上の複合体が解離してしまうが、ヘテロ二量体の場合、この複合体は安定化され半減期が1.5分になる。また、反応液中のイオン強度が高まってもDNAとの結合が可能になる。GABP β サブユニットは、N末端に4つのアンキリンリピートを持ち、この領域でGABP

α サブユニットのEts domainと結合すると同時に、 α サブユニットと共同した形でDNAとも相互作用する。さらにGABP β サブユニットのC末端には、GABP β サブユニット同士ホモダイマー形成のための領域があり、GABP α 、 β サブユニットのヘテロ二量体が、この領域を介してさらに大きな複合体を形成する。一方、テロメア結合因子を構成する各サブユニットには既知の構造モチーフは存在しないが、 α サブユニットのN末端側2/3が特異的DNA配列への結合能、残るC末端側の1/3はヘテロ二量体形成能を担い、また β サブユニットのN末端側2/3の領域は二量体形成能を担うことが示されている。この因子とDNAへの親和性は二量体の形成によって100倍に上昇し、また単量体では半減期は30秒ほどであるが、二量体形成によってこれは100時間以上にまで伸びた。他方、PEBP2 β サブユニットは α サブユニットのDNAとの親和性を高めるだけでなく、システイン残基を介した α サブユニットの活性化、および保護作用を持つことから、GABP、テロメア結合因子とはまた異なる特有の活性化様式を持つものと思われる。

α 、 β サブユニット間の相互作用の解析から、 β サブユニットは α サブユニットのDNA結合活性を、二つの機構によって上昇させることを示された。一つは α サブユニットとDNAとの間の結合を安定化し、複合体の解離を防ぐ機構(Kd効果)によるものであり、もう一つは不活性型の構造をとっている α サブユニットと相互作用を行うことによって活性型への構造変換を促し、DNA結合可能なサブユニットを増加させる機構(Pmax効果)である。補助因子のKd効果によるDNA結合活性の上昇は、他の転写因子においても広く一般に認められた作用であるが、一方のPmax効果によるDNA結合活性の上昇は、いまだ報告された例がない。これからこの結果が大腸菌から精製した蛋白質を使ったため、あるいは前述のプラスチック機器への吸着などの実験上のアーティファクトである可能性も完全には否定できないが、これに対して α サブユニットをin vitro翻訳系によって合成した場合にも、機器をシリコン処理し吸着を抑えた場合にも起こるため、この性質はRunt domainが持つ本来の性質であると考えられる。なお現在、この時起こる吸着は、RDが疎水性のコア構造を持つために起こるものと考えている。これに対して β サブユニットは吸着を抑える作用を持つことから、 α サブユニットの疎水性コアと相互作用し、

それをマスクするような形で複合体を形成する可能性が考えられる。このことはアフィニティーカラムによる実験時に、 α サブユニットと β サブユニットの複合体は塩濃度を高くするだけでは解離できず、1% SDSなどの溶剤を加えることによって初めてこれが可能となることから支持される。疎水性コアの存在はコンピュータによる検索によっても示される。

RDのDNA結合活性は、 β サブユニットの効果に加え、その酸化還元状態によって大きく影響されることが明らかになった。そこで程度の異なる還元環境下でのRDのDNA結合活性に対して β サブユニットがどのような影響を及ぼすかを検討するため、それぞれの場合の結合活性の定量的解析を行った。この結果、十分に還元が進んだ段階と、これが途中の段階のRDの持つ結合特性には、 β サブユニットに対する応答の大きな差異が生じた。10 mM DTTの条件下では、 β サブユニットを加えた場合、 K_d 効果と同時に P_{max} 効果が観察された。一方、300 mM DTTの条件下では、10 mM DTTのときと同様に β サブユニットによる K_d 効果が観察されたが、 P_{max} は β サブユニットがない場合も高いレベルにあり、その上昇は β サブユニットを付加してもほとんど上昇はなく、この場合 P_{max} 効果はなかったと判断した。

以上の実験結果を総合して、Runt Domainに対する β サブユニット、および酸化還元条件の影響から、次のようなDNA結合活性の調節機構モデルを構築した(図4.2.4)。Runt Domainは酸化型、還元型の二つの状態をとり、それぞれが活性型、不活性型に相当する。これら二つの状態は酸化、還元作用によって相互に変換が可能であるが、単量体の場合、低DTT濃度では両者の平衡は酸化型に片寄っており、非常に高濃度のDTTの存在下で始めて還元型に移動する。また、Runt Domainは β サブユニットの有無によって単量体、ヘテロ二量体の二つの状態をとり、 β サブユニットが過剰の場合にはほぼ一方的に二量体に移行すると考えられる。このようにRunt Domainには都合4つの状態があるものと想定した。さらに活性型のRunt Domainは単量体、ヘテロ二量体中でそれぞれ低親和性型、高親和性型の状態を取ると考えられる。一方、不活性型(酸化型)Runt Domainにおいても、ヘテロ二量体形成そのものは活性型の場合とほぼ同様に起こることが抗体を用いた共沈

降実験によって示されているので[Akamatsu et al.未発表]、Runt Domainにおける酸化還元反応と β サブユニットとの会合反応は基本的に独立に、かつ可逆的に起こると考えられる。

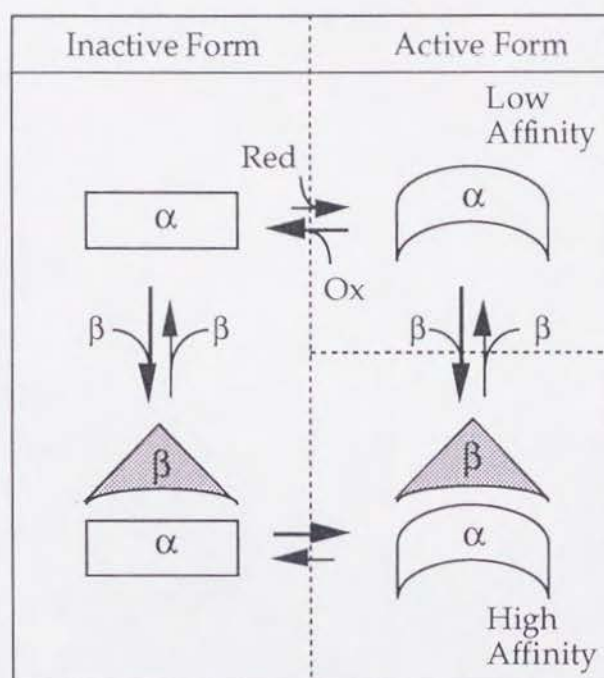


図4.2.4 Runt domainのDNA結合状態モデル

このモデルによれば、反応に還元剤を加えた場合、RDは下図の右側(還元型)の構造をとるようになり、DNAに結合可能なRunt Domainが増加す、すなわちPmax効果が生じる。また、 β サブユニットを加えた場合、RDは下図の下側(高親和性型)の構造をとるようになり、Kd効果が生じる。これによって高い還元条件では β サブユニットは、Kd効果のみが生じ、Pmax効果はないこと、また低い還元条件で β サブユニットがKd効果とPmax効果の両方を持つことの説明が可能になった。

4.2.5 Runt domainの点変異解析

欠損解析によって、Runt domainはDNA結合能、 β サブユニットとの二量体形成能を持

つ最小の機能単位であることが示された。さらにRunt domain中において、DNA結合領域はC末端側に、また β サブユニットとの相互作用領域はN末端側にそれぞれ10残基づつ片寄っていることが明らかとなった。このことからRunt domainのN末端側に変異を導入した場合、 β サブユニットとの親和性が変化した変異体が、またC末端側の場合は、DNAとの親和性が変化した、あるいは認識配列が変わった変異体がとれると期待される。そこでAkamatsuらは、RDのN末端側(94 - 158アミノ酸)にPCRを用いたランダム点変異を導入し、この領域の詳細な解析を進めた。

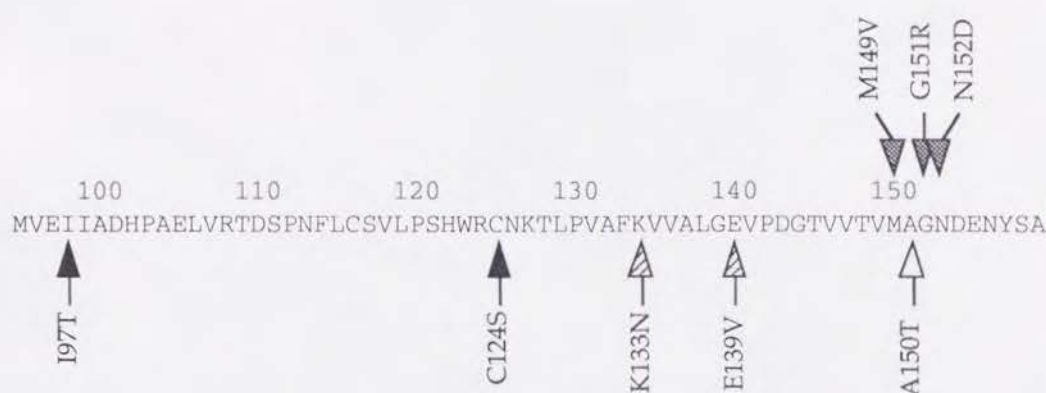


図4.2.5 変異型Runt domainにおける点変異の位置とその活性

配列は α A1のRunt domainのN末端領域のみを示した。矢印の模様はそれぞれの変異体の性質を表わす：黒、DNAとの結合活性が上昇した変異体；斜線、野生型とほぼ同じ活性を持つ変異体；白、DNA結合活性を失った変異体；灰色、 β サブユニットとのヘテロ二量体形成能が減少した変異体。

RDのN末端側への変異の導入と、ファージ発現系を用いた機能スクリーニング [Akamatsu et al., 1993]によって、次のような1アミノ酸置換の8つの変異体が単離された (図4.2.5) [Akamatsu et al., 未発表]。これらの変異体をその性質の違いによって4つのクラスに分けた。第一のクラスは、野生型のRDとほぼ同じ機能を保つ変異体、K133N (133番目のリジンがアスパラギンに変化した変異体を示す。以下この表記に準ずる。) およびE139Vからなる。第二のクラスは、当初から予定していた変異体、DNAとの親和性には変化がなく、 β サブユニットとの親和性が減少した変異体、N152D、M149V、G151R

からなり、親和性はここに並べた順に低くなる。ここでの親和性の低下の程度は、もとのアミノ酸と置換されたアミノ酸の相違の程度によって説明できる。N152D変異は中性アミノ酸から酸性アミノ酸への置換であるがこの点以外は類似の性質を持ち、このため影響は小さかったものと考えられる。M149V変異はともに疎水的性質を持つアミノ酸であるが、側鎖のサイズが大きなものから小さなものに変化しているため局所的な構造に影響を与える可能性が考えられる。最後のG151R変異は、最小で中性のアミノ酸から最長で塩基性の側鎖を持つアミノ酸への置換であり、両者の化学的、物理的性質は大きく異なる。このため β サブユニットとの親和性が大きく低下してしまったものと考えられる。このクラスに属する変異体はすべて150番目のアミノ酸の周辺に集まっており、この付近の領域が直接 β サブユニットとの相互作用を担う可能性が示唆された。また、この領域のとり二次構造はChou-Fasman法によって β シート構造と α ヘリックス構造をつなぐ、ターン構造に相当すると予測されており、多くの蛋白質-蛋白質相互作用に見出されているように、この部位がRDのコア構造からループアウトして β サブユニットと相互作用している可能性が示唆された。第三のクラスはDNA結合活性が減少した変異体、A150Tである。この変異によってRDの結合活性は約1/3に下がる。この変異によって置換されるアラニンとスレオニンはともに小型のアミノ酸であることから、この活性の阻害は立体障害によるものではなく、疎水的アミノ酸から、極性アミノ酸への置換が影響しているものと考えられる。第四のクラスはDNA結合活性が上昇した変異体であり、I97Tおよび前出のC124Sからなる。これらの変異体の単量体は1 mM DTTの条件下で、それぞれ野生型RDの約4倍、約8倍のDNA結合活性を持つ。I97T変異体は、疎水性中型の側鎖から親水性小型の側鎖への置換であり、この変異によってDNA結合活性が上昇する理由はよくわからない。一方、C124Sは前項で述べたように酸化還元調節において極めて重要な示唆を含んだ変異体であることから、以下でこれに対する結果と考察を述べる。

RD中にはCys124とCys115(それぞれ124番目、115番目のシステイン残基を示す)の、二つのシステイン残基がある。C124S変異体は、低い還元状態においても高いDNA結合活性を示し、またDTT濃度に依存した活性の上昇はあまり大きくないことから、この位置

にあるシステイン残基はDNA結合活性の酸化還元調節において重要な役割を果たすと考えられる。この変異体は、低還元状態においても高い活性を持つが、酸化処理によって失活してしまう。このことはRDのDNA結合のためには、もう一方のCys115が還元型になっている必要があること、およびこのCys115は低還元状態においても還元型をとることを示唆する。このような酸化還元特性の違いは、Cys124が正電荷を持つアミノ酸に囲まれているのに対し、Cys115の周辺には疎水性アミノ酸が存在していることによるものと考えられる。実際、システイン残基の硫黄原子の電子密度は周辺の電荷によって強く影響されるため、塩基性のアミノ酸残基に近傍するシステイン残基は非常に高い反応性を示すことが知られている[Snyder et al., 1981]。4.3.3節に述べたように、数種類の転写制御因子ファミリーにおいては実際にこのような環境にあるシステイン残基の酸化還元がDNA結合の調節に重要な役割を果たしていることが示されている。

C115がDNA結合活性に大きな影響を持つことは、この残基が欠損解析から求められた最小DNA結合領域のN末端境界のすぐ真近に位置している事実関係が深いと考えられる。これはRunt domainがこの付近でDNAとかなり直接的な相互作用する可能性を示唆する。またC115が β サブユニットによって酸化剤の攻撃から保護されるという結果は、そのすぐ上流領域がRunt domainと β サブユニットの会合に必須であることと良く符合している。したがってこの領域は β サブユニットとも直接的に接触する可能性が高いと思われる。一方、C124の役割についてはまだ手がかりが乏しいが、これもC115に比較的接近していることから、同様の議論が当てはまるであろう。

4.3 α サブユニットによるDNAの認識機構

4.3.1 転写因子によるDNA認識機構とRunt domainの二次構造

多くの場合、DNA結合蛋白質は一カ所にまとまった比較的小さなドメイン(通常20 - 60 アミノ酸)でDNAを認識する。これらの持つDNA結合モチーフは、その一次配列、およびX線結晶解析、NMR解析から明らかになった立体構造において、いくつかのグループ

に分類できる[Harrison 1991]。現在までに明らかになったDNA結合モチーフは、大まかに以下のように分類される。

- 1) ヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)モチーフ
 - 1) 真核生物転写因子
ホメオドメイン (Antp, engrailed など)、Myb など
 - 2) 原核生物のリプレッサー (λ repressor、Trp repressor など)
- 2) 亜鉛結合性モチーフ
 - 1) Znフィンガー(H2C2)タイプ (TFIIIA, Zif268 など)
 - 2) ホルモン受容体(C4)タイプ (グルココルチコイド受容体 など)
 - 3) GAL4(C6)タイプ (GAL4)
- 3) ロイシンジッパー(bZip)モチーフ
GCN4、Fos/Jun など
- 4) ヘリックス-ループ-ヘリックス(bHLH)モチーフ
Myc、MyoD、C/EBP など
- 5) β リボン(β ribbon)モチーフ
 - 1) クラス1 (Met J、Arc など)
 - 2) クラス2 (HU)
- 6) その他
 - 1) 認識ループ (NF- κ B、原核生物の制限酵素 など)
 - 2) DNA副溝認識 (HMG、TBP など)

これらのうち大部分の構造は、DNAの主溝に α ヘリックスを差し込み、これを直接塩基と相互作用させて特異的配列の認識を行い、その他の構造がモジュール同士の相互作用、DNAの主鎖との相互作用などで、このヘリックスとDNAの全体を後方から支えることによって、認識ヘリックスをDNAに対して適正な位置、角度に保つ形をしている。例えば、ヘリックス-ターン-ヘリックス構造に分類されるホメオドメイン *engrailed* は、認識ヘリックスの後方で直角に交わる2本のヘリックスが認識ヘリックスとDNAの主溝の間の構造を安定化し、また、Zif268などのタイプ1に分類されるZnフィンガーは認識ヘリックスを逆平行 β シートが支える形をしており、その間にある亜鉛イオンはこの構造をコンパクトに保つ役割をしている(図4.3.1A)。また α ヘリックスによる認識機構以外にも、上のような逆平行 β シート構造、ループ構造[Ghosh et al., 1995]、副溝結合構造

[Kim et al., 1993, Love et al., 1995]などによる認識機構が明らかになっているが、現在のところ数としてはまだ多くない。

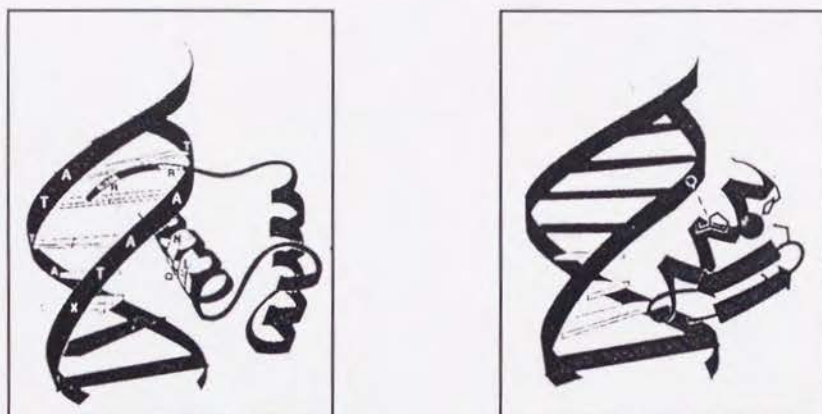


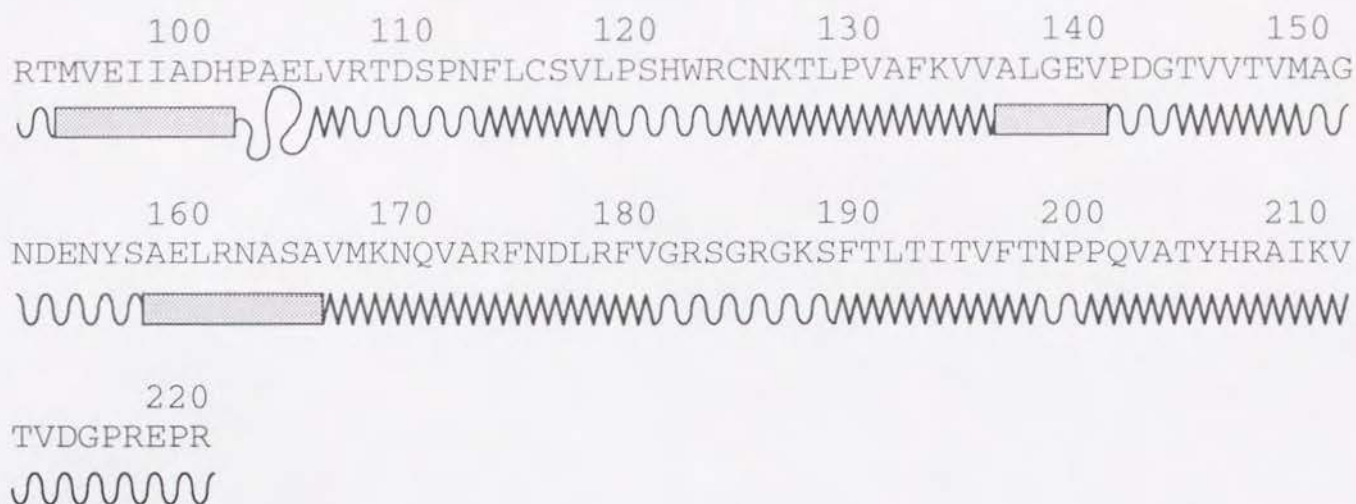
図4.3.1A DNA-蛋白質複合体の構造

左図：engrailed (ホメオドメイン)、右図：Zif268 (Znフィンガー)

Runt domainの構造は他に類似のものがなく、あるいは独特の結合様式を持っている可能性も十分あるが、大部分のDNA結合蛋白質の場合 α ヘリックス構造が認識を行っており、このドメインについてもそのように仮定した方が自然である。そこでRunt domainの二次構造をChou-Fasman法によって予測し、 α ヘリックスをとりやすい配列を検索し検討した。このような配列は3カ所あり(図4.3.1B)、これらのうち、一番N末端側の配列MVEIIADHは、この部分を削ってもDNAに結合できることから認識にかかわるヘリックスではないと考えられる。二番目の配列ALGEVは十分なヘリックスを作るためには短すぎる事、またこの領域への変異(E139V)はDNA結合能にも二量体形成能にも影響がないことから、認識ヘリックスとは考えられない[Akamatsu et al., 未発表]。三番目の配列AELRNASAは、最も認識ヘリックスに適当な特徴を持つが、この領域への変異体はまだまだなく、生化学的な裏付けは得られていない。

4.3.2 認識モジュールと塩基の相互作用

PEBP2 α A (Runt domain)



PEBP2 β 1

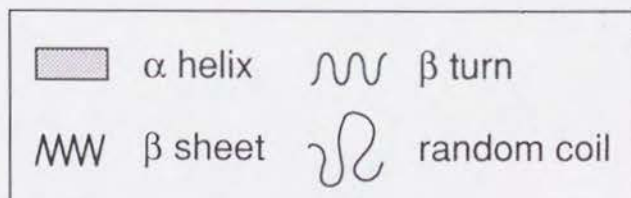
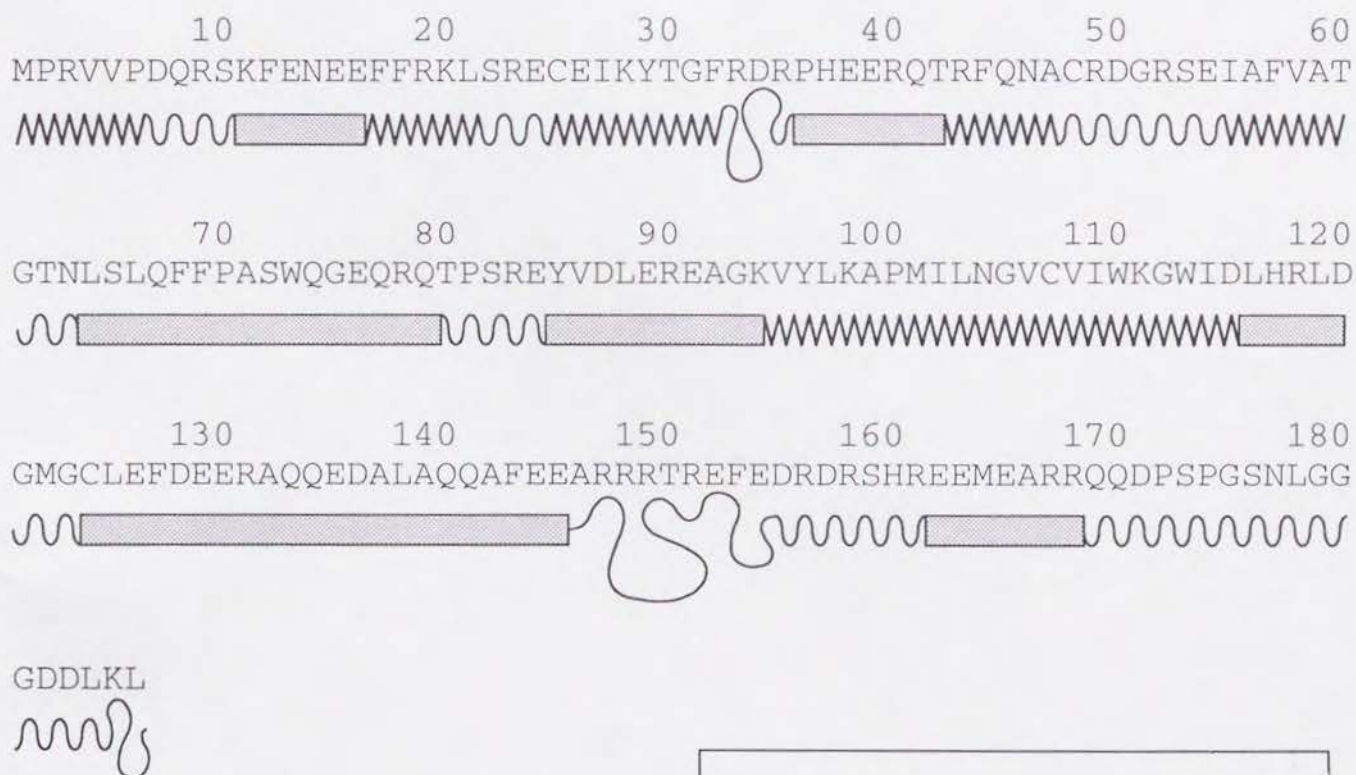


図4.3.1B Chou-Fasman法によって予測されたRunt domainおよび β サブユニットの二次構造

DNA結合モチーフは特異的DNA配列の認識を、主にアミノ酸の側鎖と塩基との間の水素結合、疎水結合によって行う。私はDNA結合蛋白質の構造とその認識に興味を持ち、DNAと蛋白質の共結晶の解析データから [Jordan & Pabo 1988, Aggarwal et al., 1988, Otwinowski et al., 1988, Kissinger et al., 1990, Schultz et al., 1991, Wolberger et al., 1991, Luisi et al., 1991, Pavletich & Pabo 1991, Marmorstein et al., 1992, Ellenberger et al., 1992, Somers & Phillips 1992, Hegde et al., 1992, Assa-Munt et al., 1993, Schwabe et al., '93, Ferre-D'Amare et al., 1993, Clark et al., 1993, Klemm et al., 1994, Raumann et al., 1994, Glover & Harrison 1995]、各アミノ酸側鎖とその認識塩基の組み合わせを分類しているうちに、ある一定の組み合わせがあることに気付いた(図4.3.2A)。例えば、アルギニン残基とグアニンヌクレオチド、アスパラギン残基とアデニンヌクレオチド、またイソロイシン残基とチミンヌクレオチド、などの組み合わせである。さらに、これらアミノ酸側鎖とその認識塩基の組は、それぞれある決まった水素結合のドナーとアクセプターによって、

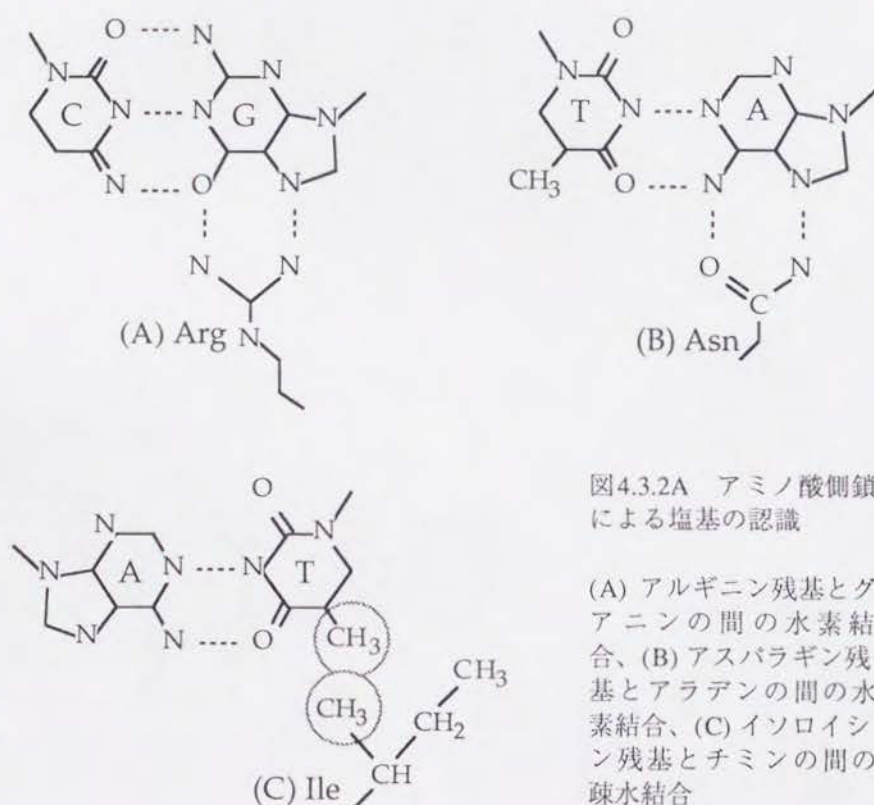


図4.3.2A アミノ酸側鎖による塩基の認識

(A) アルギニン残基とグアニンの間の水素結合、(B) アスパラギン残基とアデニンの間の水素結合、(C) イソロイシン残基とチミンの間の疎水結合

Side Chain

	A			G			C			T			
	N ⁷	N ⁶	minor	N ⁷	O ⁶	minor	C ⁵	N ⁴	minor	CH ₃	O ⁴	minor	
Ala										GCN			x2
Arg				Trp GCN MAT Zif GR CAP CAP Max (E2)	Trp GCN MAT Zif GR CAP CAP Max (E2)						CAP	MATx2 en	x5 x2
Asn	(GCN) MAT en E2	(GCN) MAT en		λcI				GCN E2,(E2)			GCN		
Cys		E2			E2								
Gln	λcI 434	λcI 434		434	434					434 434x2 en		434	
Glu		Max						Max CAP					
His				Zif Max									
Ile										Trp en			
Lys				MetJ (Trp) GAL GR (E2 (E2)	MetJ GAL (GR) lam E2 E2							MetJ	
Phe										E2			
Ser				λcI						GCN MAT 434			
Thr	(Trp)	MetJ (Trp)											
Val										434 GR			

Main Chain

Ala(N)		(Trp)		(Trp)	(Trp)								
Ile(N)													
Lys(O)													
Lys(O)								GAL GALx2					

図4.3.2B 主溝におけるDNA結合性アミノ酸残基とその認識塩基

DNAの主溝において直接、塩基と相互作用を行うアミノ酸残基とその認識塩基の関係を表にした。表は、どのアミノ酸が塩基のどの位置の基を認識しているかを、そのアミノ酸を持つDNA結合因子の名前で示した(Trp, トリプレッサー; GCN, GCN4; MAT, MAT α 2; Zif, Zif268; GR, グルココルチコイド受容体; CAP, CAP; Max, Max; E2, パピローマウイルスE2蛋白質; en, engrailed; λcI, ラムダファージリプレッサー; 434, 434ファージリプレッサー; MetJ, MetJリプレッサー; GAL, GAL4)。一つのアミノ酸が行う相互作用は横に一行で示した。また、カッコで示したものは水分子を介した水素結合を行うものを示し、x2などはその結合が複数存在することを示す。

または疎水作用を持つ官能基によって、お互いの間に結合を作ることがわかった(図4.3.1B)。すなわち、アルギニン、リジン残基は水素結合ドナーのみを持ち、これらがグアニン環の水素結合アクセプターである6位と7位の酸素と水素結合を行うことが多く、アスパラギン、グルタミン残基は一つずつのドナーとアクセプターを持つことから、これらはそれぞれアデニン環の窒素、6位のドナー、7位のアクセプターとの間に水素結合を高頻度で形成する。一方、イソロイシン、アラニン、バリン、フェニルアラニン残基などの疎水的側鎖は、チミンの5位にあるメチル基との間に疎水結合を行う。また少々意外であったのは、親水性のセリン、スレオニン残基では、水酸基はあまり塩基の認識には寄与せず、むしろこれらの側鎖の中にあるメチル基がチミンの5位のメチル基と相互作用することによって認識を行うことであったが、水酸基は水素結合のドナーともアクセプターとも、あるいはその両方ともなり得るため、認識の特異性に欠け、この点においてあまり有効でないために水酸基は塩基の認識には使用されにくいものと推察されている[Suzuki et al., 1994c]。ここで述べたような規則は、 α ヘリックスによって認識を行うDNA認識蛋白質はもちろん、 β シートや副溝を認識するDNA認識蛋白質においても成立し、広く一般的な規則として適用することができる。私は、以上のような事実について考察を進めていたが、同時期、一歩先んじた内容の論文が発表された。

Suzukiらは、前述のようなアミノ酸側鎖と塩基の間の結合規則(Chemical Rule)に加え、立体構造上の規則(Stereochemical Rule)を見い出し、さらに発展させた形で認識機構の一般化を試みた[Suzuki 1993, Suzuki et al., 1994a, Suzuki 1994b, Suzuki & Yagi 1994c]。Chemical Ruleについては、既に説明した規則と同様なものであったが、そのそれぞれの間の結合に得点(Chemical merit point, CP)をつけ、これらを相対的に評価できるようにした(図4.3.2C)。また、さらにDNAの認識においてChemical Rule同様に重要なのは、蛋白質とDNAの相互作用面側にあるアミノ酸側鎖と、主溝側にある塩基との間の位置関係であることは明白であることから、X線結晶解析やNMRのデータをもとに、蛋白質によるDNAの認識形態を、 α ヘリックスが主溝に侵入する角度とその位置によっていくつかのクラスに分類した。彼らはこれをStereochemical Ruleと呼び、 α ヘリックスとDNAの主溝

の間の立体構造上の関係をこれで表わした。Stereochemical RuleはChemical Ruleのような一般的な規則とは違い、それぞれのDNA結合構造に特異的な規則となる。現在までに示されたStereochemical Ruleは以下のように分類されており、それぞれの包含する次の構造に対して適応できる。

- 1) プローブヘリックス(PH)クラス
ホメオドメイン、ロイシンジッパーなど
- 2) ヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)クラス
原核生物のリプレッサーなど
- 3) Znフィンガー(Znf)クラス
Zif268、TFIIIAなど
- 4) C4亜鉛結合(C4)クラス
グルココルチコイド受容体、GATA1など

認識ヘリックスにあるアミノ酸残基は、DNAの主溝側にある4つの残基だけが塩基の認識に関与でき、逆にDNA上の塩基から見ると、認識ヘリックスが主溝の中にある3-4塩基対の範囲の塩基だけが認識に関与することができる。これらのアミノ酸側鎖と認識塩基の間の距離に基づいて、それぞれの位置にあるアミノ酸側鎖の大きさによって、得点(Stereochemical merit point, SP)をつけ、これらに対してもChemical Rule同様に相対的に評価できるようにした(図4.3.2C)。彼らはこれらの規則によって得られた得点(CPおよびSP)を用いて、任意の認識ヘリックスとDNA配列の間の結合性を、結合得点(Binding Score, BS)の形で客観的に評価した。結合得点BSは、それぞれのCPとSPの積の総和によって得られる。彼らはこの方法によって、任意のDNA配列の中から特定のDNA結合因子の結合部位を計算によって推定したが、これらの部位のうち93 - 100 %が実際の結合部位であることがわかり、結合得点による評価が信頼できることが示された[Suzuki et al., 1994c]。

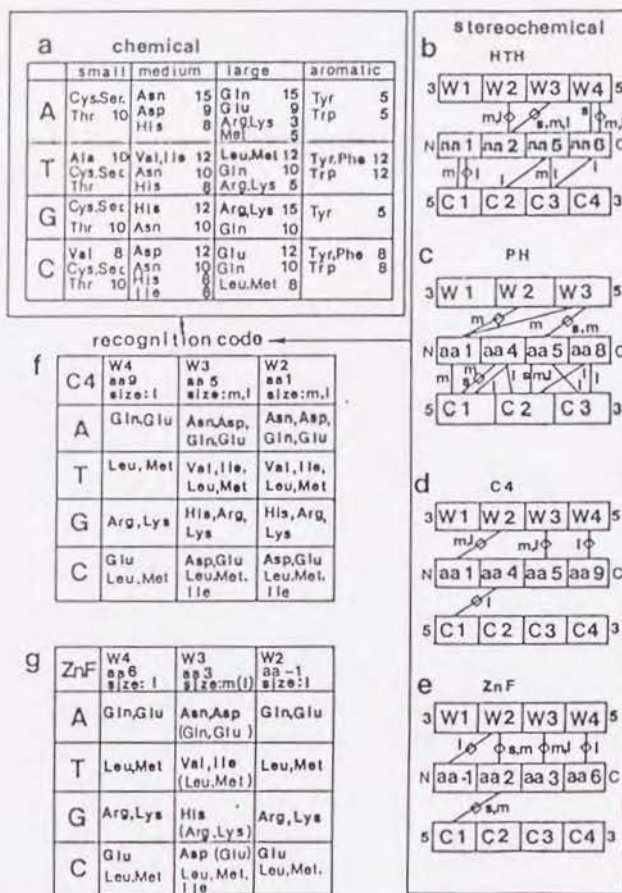


図4.3.2C DNA認識蛋白質におけるChemical、およびStereochemical rule

a) Chemical rule、b - e) Stereochemical rule、f, g) 個別の構造に対する認識コードの例 (C4、ZnF構造)

Runt domainの構造は全く明らかになっていないが、上記のように α ヘリックス構造が認識を行っているとは仮定した場合、その認識配列RACCRCAから逆に、認識を行うヘリックスの位置が推定できるのではないかと考えられた。そこでRunt domainのアミノ酸配列の中から、DNA配列RACCRCA(またはTGYGGTY)を認識にするのに最適な部分を予測するプログラムを作り、このようなアミノ酸配列を検索した。その結果、特別に高い得点(BS)を持つ配列を得ることはできなかったが、100 - 125アミノ酸の領域、および160 - 175アミノ酸の領域に比較的高い得点を持つ配列が集中していた(図4.3.2D)。100 - 125アミノ酸の領域のうち、まず100から113アミノ酸までの領域についての可能性は、欠損解析の結果 α N113がDNA結合活性を持つことからからまず棄却できる。また残る120 - 125アミノ酸の領域は、酸化還元調節を受けると考えられているシステイン残基Cys124が含まれており、この領域がDNA結合に関与すると考えるのは魅力的である。しかし、二次

構造の予測の結果、この領域は β ターン構造をとりやすいと計算されているため、この考えには疑問の余地がある。これに対して160-175アミノ酸の領域は、Runt domain中に高い頻度で含まれるプロリン、グリシンなどの α ヘリックスを壊すアミノ酸は含まれず、またChou-Fasmanによる二次構造予測によって、比較的 α ヘリックスをとりやすい配列であることから、非常に可能性が高いものと推察される。この予想を明らかにするために、AkamatsuらによってなされたN末端領域へのランダム点変異の導入をさらにC末端領域にまで広げること、あるいはこの領域でのアラニンスキャニングなどによってさらに詳細な解析を進めて行く必要がある。これらによって認識を直接担うアミノ酸残基を明らかにできれば、さらにChemical Rule、Stereochemical Ruleを参考にサイトダイレクト変異を行い、その認識配列を任意に変えることもできるようになると期待される。

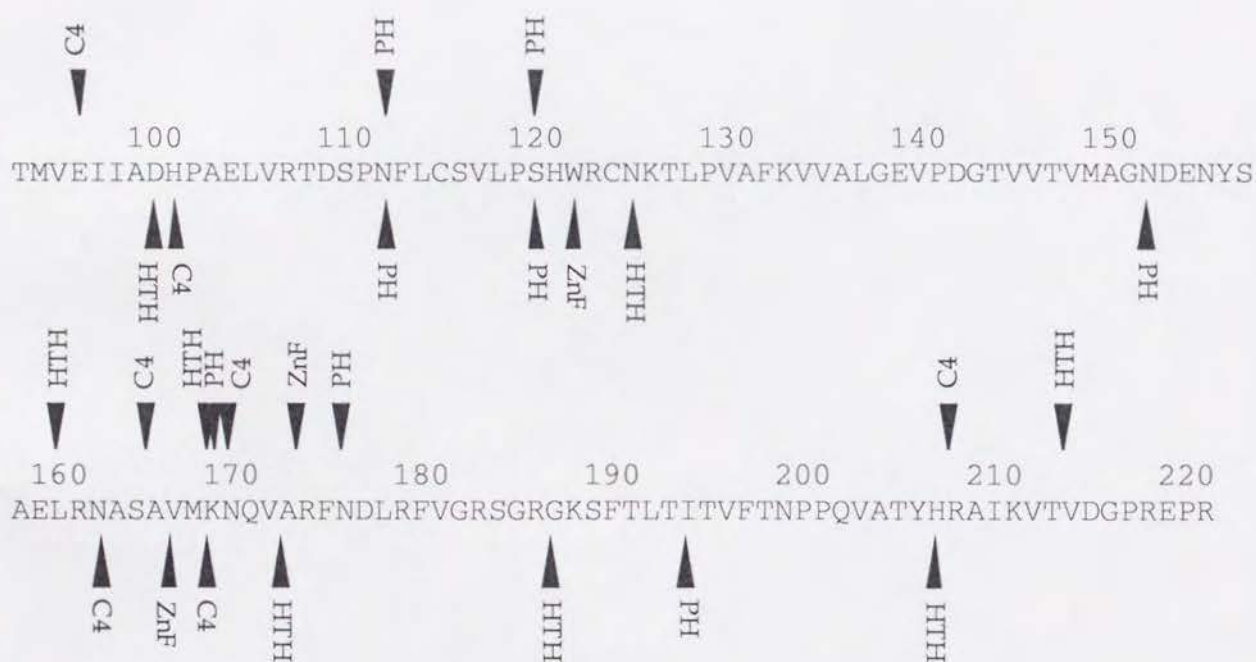


図4.3.2D PEBP2結合配列を認識する可能性のある配列の位置

DNAとヘリックスの立体構造上の位置関係をPH、HTH、Znf、C4構造と仮定した場合に、高い結合得点を得る配列の位置を黒三角で示した。下向き、上向きの三角形は、それぞれ認識配列を表(RACCRCA)、または裏(TGYGGTY)から検索した場合の高得点の位置。

4.3.3 認識モジュールとDNA骨格との相互作用

ここまでは主にアミノ酸側鎖とDNAの塩基の間の相互作用について述べてきたが、DNA結合モチーフとDNA骨格との相互作用は同様の重要性を持つ。現在までに知られているDNA-蛋白質複合体においては、その結合力の約半分はDNA骨格との間の相互作用によるものである。これらの相互作用のほとんどはDNA骨格のリン酸との間の水素結合であり、糖との疎水的な結合の場合もあるが例は少ない。このリン酸との相互作用は、ほとんどすべてのアミノ酸残基によって行われ、塩基性もしくは極性アミノ酸はもちろん、酸性アミノ酸も Mg^{2+} 、 Ca^{2+} など2価のイオンを介して相互作用できる。DNA結合モチーフの中の認識モジュールは、DNA骨格との相互作用によって塩基対に対して適正な位置をとることができ、これによって側鎖との結合の特異性を高める。さらにこの相互作用によってDNAに屈曲を導入し、これによって認識モジュールが主溝内の塩基の認識を助ける。

Runt domainのC末端の10アミノ酸は、削ってもヘテロ二量体形成は可能だが、DNA結合活性を失ってしまう。このことからこの部分は、全体の構造をこわすような領域ではないが、DNAの認識にかかわっているものと推定される。この領域には塩基性アミノ酸が数個存在しており、ホメオドメインのN末端にあるアーム構造のようにDNA結合を補助する機能を持つ可能性が考えられる。

4.4 α 、 β サブユニットの生体内での役割

4.4.1 PEBP2 α 、 β サブユニットの染色体マッピング

PEBP2 β サブユニットは一つの遺伝子からコードされていることが明らかになっているが、PEBP2 α サブユニット遺伝子には αA 、 αB 、 αC の3つのサブファミリーがあり、これらは染色体マッピングによって異なる染色体上に存在していることが示された[Bae et al., 1994, Bae et al., 1995]。

α Aはマウス17番染色体の中央部にマップされた。この遺伝子のヒト染色体上の位置はまだ正確にはあきらかになってはいないが、ヒトとマウスの染色体の対応関係から6番(6p)、19番(19p)、あるいは5番(5q)染色体上に存在していると考えられる。 α BはヒトのAML1遺伝子のマウスホモログである。この遺伝子は、マウスの16番染色体の末端に近い位置にマップされた。この位置はヒトでは21番染色体上の21q21-21q22の位置に相当する。すでに繰り返し述べた通り、この位置はM2タイプの急性骨髄性白血病関連のt(8;21)、t(3;21)染色体転座の転座点21q22と一致する。 α Cはヒトの1番染色体にマップされ、1p36.11-36.13の位置に存在していることが示されている。一方、 β サブユニットはマウスの8番染色体上にあり、この位置はヒトの16番染色体の16q22に相当し、M4Eoタイプの急性骨髄性白血病関連のinv(16) (p13q22)染色体転座の転座点と一致する。

4.4.2 PEBP2 α 、 β サブユニットのmRNAレベルでの発現様式

マウス組織から調整したmRNAを用いたノーザン解析、およびマウス組織を用いたin situハイブリダイゼーション解析によって、 α A、 α Bは組織特異的な発現をおこなっていることが示された[Bae et al., 1994, Satake et al., 1995]。 α Aは胸腺の細胞において、また α Bは胸腺、脾臓の細胞において特に強く発現している。また培養細胞から調製したmRNAを用いた場合、 α Aの発現はT細胞由来の株化細胞(EL4, BW5147)と繊維芽細胞由来のNIH3T3細胞でのみ検出され、 α Bは上記の細胞以外にB細胞由来の株化細胞(M12, L1210)でも検出され、さらに最も高いレベルでの発現はpre-B細胞株である70Z3で観察された[Bae et al., 1993, Ogawa et al., 1993a]。以上の結果からPEBP2 α Aは主としてT細胞の、 α BはT細胞、B細胞を含むリンパ細胞の分化に関与していることが示唆される[Ogawa et al., 1993a, Bae et al., 1994, Satake et al., 1995]。またさらに α Bは、そのヒトホモログであるAML1のmRNAレベルでの発現パターンから、血球系全般の増殖、分化の制御を行う可能性が示唆されている。一方、これらとは異なり α Cは、細胞種によらず幅広い発現パターンを持つことが示されている[Zhang et al., 未発表]。

一方、 β サブユニットはマウス組織から調製したmRNA、および培養細胞から調製し

たmRNAを用いたノーザン解析の結果、組織非特異的な発現パターンを持ち、どの臓器にも発現していることが示された[Ogawa et al., 1993b, Wang et al., 1993, Satake et al., 1995]。

4.4.3 α 、 β サブユニットの細胞内局在性

PEBP2の α サブユニット、 αA 、 αB 、 αC はいずれも典型的な核局在シグナル配列を持たず、 β サブユニットがこのシグナル類似の配列を持っていたことから、当初は α サブユニットは β サブユニットと二量体を形成することによって初めて核移行を行うのではないかと推測されていた。そこでLuらは α 、 β サブユニットに対する抗血清を調製し、各サブユニットを強制発現させた細胞を蛍光染色することによって、 αA 、 αB 、および β サブユニットの細胞内局在性についての検討を行った[Lu et al., 1995]。その結果この予想とは反対に、 α サブユニットは単独でも核に局在したが、 β サブユニットは単独では核移行できず細胞質内にとどまっていた。さらに両者を共発現させた場合においても、 α サブユニットは核に局在したが、依然として β サブユニットの核移行は起こらなかった。これに対してRunt domainよりN末端側、あるいはC末端側のいずれかの配列を欠失した α サブユニットは、 β サブユニットを伴って核に局在することが判明した。これは α サブユニットのN末端領域、およびC末端領域は β サブユニットを伴っての核移行に関して抑制的に働くことを示す。またこの結果は、t(8;21)およびt(3;21)染色体転座によって生じる融合遺伝子においてはRunt domainのC末端側が失われていることと何らかの関係を持つ可能性が考えられる。さらにLuらは、inv(16)染色体転座によって生じる、 β サブユニットのミオシン重鎖との融合遺伝子産物は、欠損のない α サブユニットによっても速やかに核内に移動することを示した。以上の結果から、PEBP2による転写活性化の調節には、核移行による制御機構もまた重要な役割を持ち、これらが白血病の発症に大きく関わっている可能性が示唆された。

4.4.4 リンパ細胞特異的遺伝子の発現制御におけるPEBP2の役割

PEBP2結合配列は多くのリンパ細胞特異的遺伝子の発現制御を行うエレメントに見い出され、現在までに以下にあげたようなエンハンサー配列と、そこに結合する因子が同定されている。Moloneyマウス白血病ウイルス(MuLV)のエンハンサーコアに結合する因子としてCore Binding Factor (CBF)が同定され[Wang & Speck 1992]、またマウスT細胞に白血病を起こすレトロウイルスSL3-3のLTR中のエンハンサーに結合する因子SEF-1が同定されている[Thornell et al., 1988, Boral et al., 1989]。さらに白血球ペルオキシダーゼ遺伝子のエンハンサーに結合する因子としてMyNF1が同定された[Suzow & Freedman 1993]。これらはすべてR/TACCRCA配列(PEBP2結合配列)を認識することからPEBP2と同一の因子であると考えられる。

また注目すべき点として、この配列は、T細胞で特異的に発現する α 、 β 、 γ 、 δ すべてのT細胞レセプター(TCR)遺伝子、およびCD4 α 、 β 、CD3 δ 、CD2 ϵ 遺伝子のエンハンサー領域に広く存在していることがあげられる[Leiden 1992, Redondo et al., 1992, Satake et al., 1992, Satake et al., 1995]。これらのうち少なくともTCR α 、 δ エンハンサーについては、PEBP2結合配列への変異の導入によってエンハンサー活性が下がってしまうことが示されている[Ho et al., 1989]。これらの結果と、さらにPEBP2 α A、 α Bサブユニットの組織特異的発現パターン、白血病との関連などから、PEBP2はリンパ細胞の分化、増殖に深く関わっていることが示された。

Ogawaらは、マウスの β TCRエンハンサーに注目して、その機能に対するPEBP2の役割を検討した。同エンハンサー中には、5つの β TCRエンハンサーコアと呼ばれる領域があり、そのうちのT β 3、T β 4コアの中に、PEBP2配列が一つずつ含まれている。Ogawaらは、まず、このT β 3-4コアのどちらの領域にも、PEBP2が実際に結合できることを示した。続いてT β 3-4コアがマウスのT細胞由来のBW5142細胞中で、エンハンサー活性を持ち、B細胞由来のL1210細胞中では活性を持たないことを示した。さらに、BW5142細胞を用いた実験で、T β 3、T β 4コアの一方、あるいは両方のPEBP2結合配列の2ヶ所に点変異を導入すると、特にT β 3の変異で、エンハンサー活性が著しく低下することを明らかにした。一方、L1210細胞でも α A1サブユニットcDNAを導入、発現さ

せることによって、T β 3-4コアのエンハンサー活性が上昇することがわかった。以上のような証拠から、T細胞特異的な遺伝子の発現に、PEBP2 α Aが関与していることが強く示唆された[Ogawa et al., 1993a]。

4.4.5 α サブユニットによる転写の活性化

α サブユニットの転写活性化領域の同定は、主に α B1をもとにして進められた。Ogawaらは一連の α B1サブユニット欠損変異体を発現するエフェクタープラスミドを調整し、これを胚性幹細胞P19に導入してその活性を解析した。そのレポーターとして、PEBP2に依存した転写活性化が起こることが示されているT細胞受容体 β エンハンサーのコア配列、T β 3およびT β 4(それぞれ、PEBP2およびEtsの結合配列を一つずつ含む)の支配下に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子をつないだ形のプラスミドを用いた[Bae et al., 1993, Ogawa et al., 未発表]。

まず全長の α B1を用いた場合、レポータープラスミド2 μ gに対して1 μ gのエフェクタープラスミドをコトランスフェクトした場合に最大の転写活性化が検出され、これ以上にエフェクターを加えた場合はむしろ転写活性の減少が観察された。一般に転写因子は、その発現量と転写活性化能の間には正の比例関係が成立するとは限らず、過剰に発現させると逆に転写抑制を起こす。この現象はスケルチングまたはクエンチングとして知られており、転写活性化に必要なコアクチベーター、メディエーターと呼ばれる基本転写因子などが、過剰に存在する転写因子によって吸収されてしまうために起こると考えられている[Ptashne & Gann 1990]。

引き続きN末端、C末端からの欠損変異体の転写活性化能を同様に解析したところ、Runt domainよりN末端側の欠損はその程度によらず転写活性化能にほとんど影響しなかった。一方、Runt familyのメンバーにおいて完全に保存されているC末端のVWRPY配列を欠失させても活性に影響はなかったが、さらに欠損を進めてゆくとその欠損の程度に応じて活性化能が減少して行った。この時291から371アミノ酸の領域に欠失が進んだ場合に、とくに著しい活性減少が観察された。最終的にC末端領域を243アミ

ノ酸まで欠失させた時点で、 α B1は完全に転写活性化能を失った。また、Runt domainの部分だけをエフェクタープラスミドに組み込んだ場合においても同様に転写活性化は全く起こらなかった。この結果から、 α B1の転写活性化能はプロリン、セリン、スレオニンに富むC末端側の大きな領域(244 - 446アミノ酸の領域、特に291 - 371アミノ酸の領域)が全体として担っていることが示された[Ogawa et al.,未発表]。

さらに以上の結果をもとにSakakuraらは、t(8;21)染色体転座によって癌化した細胞(Kasumi-1)に、Runt domain部分だけを発現させることによって、またはこの領域のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することによって、この細胞の無限増殖能を抑え、分化の誘導を行うことに成功した[Sakakura et al., 1994]。この結果、PEBP2結合配列を介した転写制御は、白血病細胞Kasumi-1の増殖、癌化に大きな影響を与えること、またt(8;21)染色体転座によって生じる融合遺伝子産物(AML1-MTG8)の発現が、白血病の表現型を維持するために必要であることが明らかになった。

Ogawaらはさらに詳細に転写活性化領域を同定するために、 α B1のC末端部分を酵母の転写因子Gal4に融合させた形のエフェクタープラスミドと、Gal4結合配列をCAT遺伝子上流につないだレポータープラスミドを用いて実験を行ったが、どの領域を用いた場合においても転写の活性化は観察されなかった[Ogawa et al.,未発表]。このことから、T β 3 - T β 4エンハンサーを介した転写には α サブユニットの全体が必要であることが示された。これは、PEBP2による転写の活性化にはそれ自体では不十分で、例えばRunt domainなどが他の因子との蛋白質-蛋白質の相互作用を行う必要か、エンハンサー領域全体としてのDNAの配列もしくは構造が重要であることを示唆する。

4.4.6 Runt domain内の点変異が転写活性化に及ぼす影響

Akamatsuらは、4.3.5節で述べた点変異Runt domainのうち、DNAとの結合活性が上昇したC124S変異体、および β サブユニットとの親和性が低化したM149V、G151R変異体から得られた知見をもとに、全長の α A1のRunt domainの部分にこの様な変異を導入したエフェクタープラスミドを構築し、4.4.4節で述べた方法によって転写活性化におけるこ

これらの変異の影響を調べた。野性型 α A1サブユニットによる転写活性化は、 α B1の場合と同様に1 μ gのエフェクタープラスミドを導入した場合に最大となり、これ以上加えても徐々に抑制されて行った。これに対してC124S変異型 α A1の場合、この変異のDNA結合活性は構成的に高くなっていることから、その転写活性化能は野性型のものよりも上昇していることが期待されたが、実際は転写活性化能は野性型ものとはほぼ同じであることがわかった。この結果は、細胞内の環境においてRunt domainのシステイン残基は、種々の還元物質や補助蛋白質因子の働きで十分に還元されており、C124S変異体と同程度のDNA結合活性を持つことを示唆する。一方、M149V、G151R型の α A1の場合、転写活性化能は野性型のものよりも明らかに低化しており、その程度はM149V、G151Rの順で低くなり、 β サブユニットとの親和性の低下の程度とよく一致する。 β サブユニットは普遍的な発現パターンを示し、またこのサブユニットにはGal4融合蛋白質による検討の結果、転写活性化領域が存在しないことから[Ogawa et al., 未発表]、転写に対する役割が不明であったが、以上の結果から、 β サブユニットがPEBP2依存性の転写活性化に重要な役割を担っており、効率よい転写の活性化に必須であることが示された[Akamatsu et al., 未発表]。

4.4.7 他の転写因子との相互作用

これまでの議論では α 、 β サブユニットは二つで一組となって働く転写調節因子であり、進化的にまた機能的にこの関係が保存されていることを強調したが、一方でこの両者は次のように対照的な挙動を示すことを指摘しておかねばならない。 α サブユニットの発現は細胞特異的であり未分化のF9、P19などでは検出されないのに対し、 β サブユニットは細胞種によらず普遍的に発現している[Satake et al., 1992, Ogawa et al., 1993a, Ogawa et al., 1993b]。また細胞の免疫染色から α サブユニットは核に局在するのに対し、 β サブユニットは大部分が細胞質に分布していることが示された[Lu et al., 1995]。このような知見から、 α 、 β サブユニットが時間的、空間的に個別に行動し、それぞれ異なる機能を持つ蛋白質と相互作用することによって、未知のより多彩な役割を果たしてい

る可能性が考えられる。これに対して実際、PEBP2は、転写因子Ets、およびMybとそれぞれTCR β 、 δ エンハンサーにおいて直接相互作用し、それぞれの結合配列に対し協調的に結合していることが示された[Wotton et al., 1994, Hernandez-Munain et al., 1994, Sun et al., 1995]。このことからPEBP2は複数の転写因子との協調的な結合によって、その相手の持つ機能を修飾している可能性が考えられる。また、ショウジョウバエのRunt遺伝子産物は、*fushi-tarazu*、*bicoid*などの遺伝子産物の機能をDNA結合を直接介することなしに、蛋白質-蛋白質相互作用によって制御している可能性が示唆されている[Paroush et al., 1994, Tsai & Gergen 1995a, Tsai & Gergen 1995b]。PEBP2結合配列は、Ets、MybだけでなくC/EBP、GATAなどの結合配列と組になってエンハンサー内に存在していることが多く、 α 、 β サブユニットを中心とした転写制御ネットワークはこの二つの因子のみならず、多様な因子へと広がっているものと考えられる。

4.4.8 エンハンサーエレメントにおける転写因子複合体の高次構造による調節

TCR α エンハンサーの中には5'上流から順に、ATF/CREB、LEF-1、2つのPEBP2、Ets-1結合配列が含まれている。Gieseらは、このエンハンサーの活性を再構成するためには、これらすべての蛋白質因子とその結合配列の特別な配置が必要であることを示した。Ets-1とPEBP2とが協調してそれぞれの結合配列に結合することはすでに述べたが、転写活性化が起こるためにはさらに、HMGドメインを持ちTCR α エンハンサーを中央部で屈曲させる因子LEF-1の結合、およびPEBP2/Ets-1結合配列に対してDNAヘリックス上で特別なhelical phasingを持つ位置にATF/CREBが結合することが必要となる[Giese et al., 1995]。この結果に基づいて彼等は、エンハンサーの活性には、単純に転写因子とエンハンサーの配列だけでなく、その全体から構成される転写因子-DNA複合体の特殊な高次構造(Architecture)が重要であるとの考えに達し、Architectural proteinという概念を提唱した。

4.5 結びと今後の展望

本研究によってPEBP2 α を初めとするRuntファミリー遺伝子群が共有するRunt domainとそのパートナーサブユニットである β 蛋白の構造、ならびに活性調節の分子機構について多くの新しい知見が得られた。今後はこれを基盤としてこの因子の構造機能連関を分子レベルでより深く掘り下げると共に、その生体レベルでの機能の解析を多面的に展開していく必要がある。特に重要と思われるのは、この因子と相互作用を行なう蛋白質群の系統的探索である。それによってこの遺伝子群を中心とする転写制御ネットワークの広がりをつまえることが出来ると期待される。さらに、Runtファミリー蛋白と β サブユニットがどれだけの範囲の生物種に渡って分布しているか、また各蛋白群のメンバー数と構造が進化とともにどのように変化してきたかも興味深い問題である。こうした追究によって、この因子の細胞の分化および増殖制御における役割の全体像が明らかになるものと期待される。

謝辞

この論文を終えるにあたって、本研究を直接ご指導下さり、終始適切な御指導、ならびに御助言下さいました重定勝哉先生に心から感謝いたします。本研究全般にわたってご協力下さいました伊藤嘉明先生をはじめ、細胞制御部門の皆様には、厚く御礼申し上げます。淀井淳司先生および感染防御部門の皆様には、酸化還元制御に関する適切な御助言いただき大変お世話になりました。また、終始励ましのお言葉を下り、多方面にわたってお世話になりました西田栄介先生、後藤由紀子先生に深く感謝いたします。赤松謙子博士をはじめとする共同研究者の皆様には、貴重な資料の提供、また実験技術について御助言いただきました。堀口大悟氏をはじめ情報高分子部門の皆様には、公私にわたりお世話になりました。最後に、事務手続きや実験など、様々にご協力下さいました技官田中喜代子さんに感謝の意を表します。

参考文献

1. Abate, C., D. Luk, and T. Curran. 1990a. *Cell Growth. Differ.* 1: 455-462.
2. Abate, C., D. Luk, R. Gentz, F. J. R. III, and T. Curran. 1990b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1032-1036.
3. Aggarwal, A. K., D. W. Rodgers, M. Drott, M. Ptashne, and S. C. Harrison. 1988. *Science* 242: 899-907.
4. Akamatsu, Y., M. S. Cole, J. Y. Tso, and N. Tsurushita. 1993. *J. Immunol.* 151: 4651-4659.
5. Amati, P. 1985. *Cell* 43: 561-562.
6. Assa-Munt, N., R. J. Mortishire-Smith, R. Aurora, W. Herr, and P. E. Wright. 1993. *Cell* 73: 193-205.
7. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).
8. Aves, S. J., B. W. Durckacz, and A. Carr. 1985. *EMBO J.* 4: 457-463.
9. Bae, S. C., E. Ogawa, M. Maruyama, H. Oka, M. Satake, K. Shigesada, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, and Y. Ito. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3242-3252.
10. Bae, S. C., E. Takahashi, Y. W. Zhang, E. Ogawa, K. Shigesada, Y. Namba, M. Satake, and Y. Ito. 1995. *Gene* 159: 245-248.
11. Bae, S. C., Y. Yamaguchi-Iwai, E. Ogawa, M. Maruyama, M. Inuzuka, H. Kagoshima, K. Shigesada, M. Satake, and Y. Ito. 1993. *Oncogene* 8: 809-814.
12. Barron, E. B. 1951. *Adv. Enzymol. Relat. Subjects Biochem.* 11: 201.
13. Biggin, M. D., and R. Tjian. 1989. *Cell* 58: 433-440.
14. Blackwell, T. K., L. Kretzner, E. M. Blackwood, R. N. Eisenman, and H. Weintraub. 1990. *Science* 250: 1149-1151.
15. Blackwood, E. M., and R. N. Eisenman. 1991. *Science* 251: 1211-1217.
16. Bohmann, D., T. J. Bos, A. Admon, T. Nishimura, P. K. Vogt, and R. Tjian. 1987. *Science* 238: 1386-1392.
17. Boral, A. L., S. A. Okenquist, and J. Lenz. 1989. *J. Virol.* 63: 76-84.
18. Borelli, E., R. Hen, and P. Chambon. 1984. *Nature* 312: 608-612.
19. Brawerman, G. 1989. *Cell* 57: 9-10.
20. Breeden, L., and K. Nasmyth. 1987. *Nature* 329: 651-654.
21. Buluwela, L., A. Foster, T. Boehm, and T. H. Rabbitts. 1989. *Nucl. Acids Res.* 17: 452-.
22. Carroll, S. B., A. Laughon, and B. S. Thalley. 1988. *Genes & Dev.* 2: 883-890.
23. Carroll, S. B., and M. P. Scott. 1985. *Cell* 43: 47-57.
24. Caskey, C. T., A. Pizzuti, Y. H. Fu, R. G. J. Fenwick, and D. L. Nelson. 1992. *Science* 256: 784-789.
25. Chida, K., and P. K. Vogt. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4290-4294.
26. Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson, and B. N. Ames. 1985. *Cell* 41: 753-761.
27. Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai, and S. K. Burley. 1993. *Nature* 364: 412-420.
28. Cory, A., L. Patel, F. J. R. III, and T. Curran. 1990. *Science* 249: 1157-1161.
29. de Villiers, J., and W. Schaffner. 1981. *Nucl. Acids Res.* 9: 6251-6246.

30. de Villiers, J., W. Schaffner, C. Tyndall, S. Lupton, and R. Kamen. 1984. *Nature* 312: 242-246.
31. Delwel, R., T. Funabiki, B. L. Kreider, K. Morishita, and J. N. Ihle. 1993. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4291-4300.
32. Dignam, J. D., P. Martin, B. S. Shastry, and R. G. Roeder. 1983. *Methods Enzymol.* 101: 582-598.
33. Duboule, D., M. Haenlin, B. Galliot, and E. Mohier. 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2003-2006.
34. Duffy, J. B., and J. P. Gergen. 1991b. *Genes & Dev.* 5: 2176-2187.
35. Duffy, J. B., M. A. Kania, and J. P. Gergen. 1991a. *Development* 113: 1223-1230.
36. Ellenberger, T. E., C. J. Brandl, K. Struhl, and S. C. Harrison. 1992. *Cell* 71: 1223-1237.
37. Erickson, P. F., M. Robinson, G. Owens, and H. A. Drabkin. 1994. *Cancer Res.* 54: 1782-1786.
38. Fang, G., J. T. Gray, and T. R. Cech. 1993. *Genes & Dev.* 7: 870-882.
39. Feinstein, P. G., K. Kornfeld, D. S. Hogness, and R. S. Mann. 1995. *Genetics* in press.
40. Ferré-D'Amaré, A. R., G. C. Prendergast, E. B. Ziff, and S. K. Burley. 1993. *Nature* 363: 38-45.
41. Fitzpatrick, V. D., and C. J. Ingels. 1989. *Nature* 337: 666-668.
42. Frasch, M., T. Høe, C. Rushlow, H. Doyle, and M. Levine. 1987. *EMBO J.* 6: 749-759.
43. Frigerio, G., M. Burri, D. Bopp, S. Baumgartner, and M. Nell. 1986. *Cell* 47: 735-746.
44. Fu, Y. H., D. P. Kuhl, A. Pizzuti, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, S. Richards, A. J. Verkerk, J. J. Holden, R. G. J. Fenwick, W. S. T., and e. al. 1991. *Cell* 67: 1047-1058.
45. Fu, Y. H., A. Pizzuti, R. G. J. Fenwick, J. King, S. Rajnarayan, P. W. Dunne, J. Dubel, G. A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong, and e. al. 1992. *Science* 255: 1256-1258.
46. Fujimura, F. K., P. L. Deininger, T. Friedman, and E. Linney. 1981. *Cell* 23: 809-814.
47. Furukawa, K., Y. Yamaguchi, E. Ogawa, K. Shigesada, M. Satake, and Y. Ito. 1990. *Cell Growth Differ.* 1: 135-147.
48. Garriga, G., C. Guenther, and H. R. Horovitz. 1993. *Genes & Dev.* 7: 2097-2109.
49. Gerber, H.-P., K. Seipel, O. Georgiev, M. Höfferer, M. Hug, S. Rusconi, and W. Schaffner. 1994. *Science* 263: 808-811.
50. Gergen, J. P., and B. A. Butler. 1988. *Genes Dev.* 2: 1179-1193.
51. Ghosh, G., G. v. Duyne, S. Ghosh, and P. B. Sigler. 1995. *Nature* 373: 303-317.
52. Giese, K., C. Kingsley, J. R. Kirshner, and R. Grosschedl. 1995. *Genes Dev.* 9: 995-1008.
53. Gilbert, S. F. 1991. *Developmental Biology* 3rd.edition (Sinauer Associates, Inc.).
54. Glover, J. N. M., and S. C. Harrison. 1995. *Nature* 373: 257-261.
55. Golling, G., L. Li, M. Pepling, M. Stebbins, and J. P. Gergen. 1995. *Genes & Dev* submitted.
56. Goodrich, J. A., and R. Tjian. 1994. *Curr Opin Cell Biol* 6:

57. Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy, and B. Dimple. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6181-6185.
58. Group, T. H. D. C. R. 1993. *Cell* 72: 971-983.
59. Grässer, F. A., K. LaMontague, L. Whittaker, S. Stohr, and J. S. Lipsick. 1992. *Oncogene* 7: 1005-1009.
60. Guehmann, S., G. Vorbrueggen, F. Kalkbrenner, and K. Moelling. 1992. *Nucl. Acid Res.* 20: 2279-2286.
61. Hajra, A., P. P. Liu, Q. Wang, C. A. Kelley, T. Stacy, R. S. Adelstein, N. A. Speck, and F. S. Collins. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1926-1930.
62. Han, K., M. S. Levinc, and J. L. Manley. 1989. *Cell* 56: 573-583.
63. Harrison, S. C. 1991. *Nature* 353: 715-719.
64. Hassell, J. A., W. J. Muller, and C. R. Muller. 1986. *Cancer Cells* 4: 561-569.
65. Hegde, R. S., S. R. Grossman, L. A. Laimins, and P. B. Sigler. 1992. *Nature* 359: 505-512.
66. Hen, R., E. Borelli, C. Fromental, P. Sassone-Corsi, and P. Chambon. 1986. *Nature* 321: 249-251.
67. Herbolmel, P., B. Bourachot, and M. Yaniv. 1984. *Cell* 39: 653-662.
68. Herbolmel, P., S. Sarogosti, D. Blangy, and M. Yaniv. 1981. *Cell* 25: 651-658.
69. Hernandez-Munain, C., and M. S. Krangel. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14: 473-483.
70. Hernandez-Munain, C., and M. S. Krangel. 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3090-3099.
71. Ho, I. C., L. H. Yang, G. Morle, and J. M. Leiden. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6714-6718.
72. Horikoshi, M., K. C. Wong, H. Fujii, A. Cromlish, A. Weil, and G. R. Roeder. 1989. *Nature* 341: 299-303.
73. Imler, J. L., C. Schatz, C. Wasylyk, B. Chatton, and B. Wasylyk. 1988. *Nature* 332,275-278 332: 275-278.
74. Ingham, P., and P. Gergen. 1988. *Development* 104: 51-60.
75. Jaynes, J. B., and P. H. O'Farrell. 1988. *Nature* 336: 744-749.
76. Jordan, S. R., and C. O. Pabo. 1988. *Science* 242: 893-899.
77. Kagoshima, H., K. Shigesada, M. Satake, Y. Ito, H. Miyoshi, M. Ohki, M. Pepling, and J. P. Gergen. 1993. *Trend Genet* 9: 338-340.
78. Kamachi, Y., E. Ogawa, M. Asano, S. Ishida, Y. Murakami, M. Satake, Y. Ito, and K. Shigesada. 1990. *J. Virol.* 64: 4808-4819.
79. Kania, M. A., A. S. Bonner, J. B. Duffy, and J. P. Gergen. 1990. *Genes Dev.* 4: 1701-1713.
80. Katinka, M., M. Yaniv, M. Vasseur, and D. Blangy. 1980. *Cell* 20: 393-399.
81. Kieran, M., V. Blank, F. Logeat, J. Vandekerckhove, F. Lottspeich, O. Le Bail, M. B. Urban, P. Kourilsky, P. A. Baeuerle, and A. Israel. 1990. *Cell* 62: 1007-1018.
82. Kim, J. L., D. B. Nikolov, and S. K. Burley. 1993. *Nature* 365: 520-527.
83. Kissinger, C. R., B. Liu, E. Martin-Blanco, T. B. Kornberg, and C. O. Pabo. 1990. *Cell* 63: 579-590.
84. Klemm, J. D., M. A. Rould, R. Aurora, W. Herr, and C. O. Pabo. 1994. *Cell* 77: 21-32.
85. Kozak, M. 1989. *J. Cell Biol.* 108: 229-241.

86. Kozu, T., H. Miyoshi, K. Shimizu, N. Maseki, Y. Kaneko, H. Asou, N. Kamada, and M. Ohki. 1993. *Blood* 82: 1270-1276.
87. Kullik, I., M. B. Toledano, L. A. Tartaglia, and G. Storz. 1995. *J. Bacteriol.* 177: 1275-1284.
88. Kuner, J., M. Nakanishi, Z. Ali, B. Drees, E. Gustavson, J. Thies, L. Kauvar, T. Kornberg, and P. O'Farrell. 1985. *Cell* 42: 309-316.
89. Kustu, S., E. Santero, J. Keener, D. Popham, and D. Weiss. 1989. *Microbiol. Rev.* 53: 367-376.
90. La Marco, K., C. C. Thompson, B. P. Byers, E. M. Walton, and S. L. McKnight. 1991. *Science* 253: 789-791.
91. La Spada, A. R., E. M. Wilson, D. B. Lubahn, A. E. Harding, and K. H. Fischbeck. 1991. *Nature* 352: 77-79.
92. Laughon, A., and M. P. Scott. 1984. *Nature* 310: 25-31.
93. Lee, W., P. Mitchell, and R. Tjian. 1987. *Cell* 4: 741-752.
94. Leiden, J. M. 1992. *Immunology Today* 13: 22-30.
95. Leung, D. W., E. Chen, and D. V. Goeddel. 1989. *Technique* 1: 11-15.
96. Licht, J. P., M. J. Grossel, J. Figge, and U. M. Hansen. 1990. *Nature* 346: 76-79.
97. Liu, P., S. A. Tarlé, A. Hajra, D. F. Claxton, P. Marlton, M. Freedman, M. J. Siciliano, and F. S. Collins. 1993. *Science* 261: 1041-1044.
98. Ilamcs, B. D., and D. M. Glover. 1988. *Transcription and Splicing* (IRL Press, Oxford).
99. Love, J. J., X. Li, D. A. Case, K. Giese, R. Grosschedl, and P. E. Wright. 1995. *Nature* 376: 791-795.
100. Lu, J., M. Maruyama, M. Satake, S. C. Bae, E. Ogawa, H. Kagoshima, K. Shigesada, and Y. Ito. 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1651-1661.
101. Luisi, B. F., W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto, and P. B. Sigler. 1991. *Nature* 352: 497-505.
102. Marmorstein, R., M. Carey, M. Ptashne, and S. C. Harrison. 1992. *Nature* 356: 408-414.
103. Matthews, J. R., N. Wakasugi, J. Virelizier, J. Yodoi, and R. T. Hay. 1992. *Nucl. Acid Res.* 20: 3821-3830.
104. Meyers, S., J. R. Downing, and S. W. Hiebert. 1993. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6336-6345.
105. Meyers, S., N. Lenny, and S. W. Hiebert. 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1974-1982.
106. Mitani, K., S. Ogawa, T. Tanaka, H. Miyoshi, M. Kurokawa, H. Mano, Y. Yazaki, M. Ohki, and H. Hirai. 1994. *EMBO J.* 13: 504-510.
107. Mitchell, P. J., and R. Tjian. 1989. *Science* 245: 371-378.
108. Miyoshi, H., T. Kozu, K. Shimizu, K. Enomoto, N. Maseki, Y. Kaneko, N. Kamada, and M. Ohki. 1993. *EMBO J.* 12: 2715-2721.
109. Miyoshi, H., M. Ohira, K. Shimizu, H. Hirai, T. Imai, K. Yokoyama, E. Soeda, and M. Ohki. 1995. *Nucleic Acid Res.* in press.
110. Miyoshi, H., K. Shimizu, K. T., N. Maseki, Y. Kaneko, and M. Ohki. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10431-10434.
111. Morell, V. 1993. *Science* 260: 1422-1423.
112. Morishita, K., E. Parganas, D. M. Parham, T. Matsugi, and J. N. Ihle. 1990. *Oncogene* 5: 1419-1423.
113. Morishita, K., D. S. Parker, M. L. Mucenski, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and J. N. Ihle. 1988. *Cell* 54: 831-840.

114. Morishita, K., K. Suzukawa, T. Taki, J. N. Ihle, and J. Yokota. 1995. *Oncogene* 10: 1961-1967.
115. Myrest, A. H., A. Bostad, N. Jamin, P. Lirsac, F. Toma, and O. S. Gabrielsen. 1993. *EMBO J.* 12: 4625-4633.
116. Nauber, U., M. I. Pankratz, A. Kienlin, E. Seifert, U. Klemm, and H. Jackle. 1988. *Nature* 336: 489-492.
117. Ng, L., F. Douglas, and T. Curran. 1993. *Nucleic Acids Res.* 21: 5831-5837.
118. Nuchprayoon, I., S. Meyers, L. M. Scott, J. Suzow, S. Hiebert, and A. D. Friedman. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5558-5568.
119. Nucifora, G., D. J. Birn, R. E. III, P. Erickson, M. M. LeBeau, D. Roulston, T. W. McKeithan, H. Drabkin, and J. D. Rowley. 1993. *Blood* 81:
120. O'Brien, S. J. 1984. *Genetic maps* 3: 66-76 (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
121. Ogawa, E., M. Inuzuka, M. Maruyama, M. Satake, M. Naito-Fujimoto, Y. Ito, and K. Shigesada. 1993b. *Vilology* 194: 314-331.
122. Ogawa, E., M. Maruyama, H. Kagoshima, M. Inuzuka, J. Lu, M. Satake, K. Shigesada, and Y. Ito. 1993a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6859-6863.
123. Okuno, H., A. Akahori, H. Sato, S. Xanthoudakis, T. Curran, and H. Iba. 1993. *Oncogene* 8: 695-701.
124. Otwinowski, Z., R. W. Schevitz, R. Zhang, C. L. Lawson, A. Joachimiak, R. Q. Marmorstein, B. F. Luisi, and P. B. Sigler. 1988. *Nature* 335: 321-329.
125. Paroush, Z., J. R. L. Finley, T. Kidd, S. M. Wainwright, P. W. Ingham, R. Brent, and D. Ish-Horowicz. 1994. *Cell* 79: 805-815.
126. Pavletich, N. P., and C. O. Pabo. 1991. *Science* 252: 809-817.
127. Pepling, M. E., and J. P. Gergen. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press.
128. Piette, J., and M. Yaniv. 1987. *EMBO J.* 6: 1331-1337.
129. Poiriel, H., I. Radford-Weiss, K. Rack, X. Troussard, A. Veil, F. Valensi, F. Picard, M. Guesnu, D. Leboeuf, J. Melle, F. Dreyfus, G. Flandrin, and E. Macintyre. 1995. *Blood* 85: 1313-1322.
130. Ptashne, M., and A. A. F. Gann. 1990. *Nature* 346: 329-331.
131. Raumann, B. E., M. A. Rould, C. O. Pabo, and R. T. Sauer. 1994. *Nature* 367: 754-757.
132. Rauscher III, F. J., P. I. Voulalas, B. R. Franza Jr, and T. Curran. 1988. *Genes & Dev.* 2: 1687-1699.
133. Redondo, J. M., J. L. Pfohl, C. Hernandez-Munain, S. Wang, N. A. Speck, and M. S. Krangel. 1992. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4817-4823.
134. Reguski, M., K. Harding, R. Kostriken, M. Karch, M. Levine, and W. McGinnis. 1985. *Cell* 43: 71-80.
135. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. *Science* 234: 364-368.
136. Rosenberg, U. B., C. Schroder, A. Preiss, A. Kienlin, S. Cote, I. Riede, and H. Jackle. 1986. *Nature* 319: 336-339.
137. Sakakura, C., Y. Yamaguchi-Iwai, M. Satake, S. C. Bea, A. Takahashi, E. Ogawa, A. Hagiwara, T. Takahashi, A. Murakami, K. Makino, T. Nakagawa, N. Kamada, and Y. Ito. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11723-11727.

138. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning* 2nd. Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
139. Sanger, F., S. Miklen, and A. R. Coulson. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
140. Sarkar, G., S. Kapelner, and S. S. Sommer. 1990. *Nucl. Acids Res.* 18: 7465-.
141. Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, and S. Nakanishi. 1992. *Genes & Dev.* 6: 2620-2634.
142. Satake, M., T. Ibaraki, and Y. Ito. 1988. *Oncogene* 3: 69-78.
143. Satake, M., Y. Ibaraki, Y. Yamaguchi, and Y. Ito. 1989. *J. Virol.* 63: 3669-3677.
144. Satake, M., M. Inuzuka, K. Shigesada, T. Oikawa, and Y. Ito. 1992. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 714-722.
145. Satake, M., S. Nomura, Y. Yamaguchi-Iwai, Y. Takahama, Y. Hashimoto, M. Niki, Y. Kitamura, and Y. Ito. 1995. *Mol. Cel. Biol.* 15: 1662-1670.
146. Sauer, F., and H. Jackle. 1991. *Nature* 353: 563-566.
147. Schneuwly, S., A. Kuroiwa, P. Baumgartner, and W. J. Gehring. 1986. *EMBO J.* 5: 733-739.
148. Schultz, S. C., G. C. Shields, and T. A. Steitz. 1991. *Science* 253: 1001-1007.
149. Schwabe, J. W. R., L. Chapman, J. T. Finch, and D. Rhodes. 1993. *Cell* 75: 567-578.
150. Seipel, K., O. Georgiev, and W. Schaffner. 1992. *EMBO J.* 11: 4961-4968.
151. Sekikawa, K., and A. J. Levine. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1100-1104.
152. Shigesada, K., S. Itamura, M. Kato, M. Hatanaka, M. Imai, M. Tanaka, N. Masuda, J. Nagai, and K. Nakashima. 1987. *Gene* 53:
153. Shurtleff, S. A., S. Meyers, S. W. Hiebert, S. C. Raimondi, D. R. Head, C. L. Willman, S. Wolman, M. L. Slovak, A. J. Carroll, F. Behm, and e. al. 1995. *Blood* 85: 3695-3703.
154. Slack, M. W. 1991. *From Egg to Embryo* (Cambridge Univ. Press).
155. Smith, C. W. J., J. G. Patton, and B. Nadal-Ginard. 1989. *Annu. Rev. Genet.* 23: 527-577.
156. Snyder, G. H., M. J. Cennerazzo, A. J. Kavalis, and P. Field. 1981. *Biochemistry* 20: 1509-1519.
157. Somers, V. S., and S. E. V. Phillips. 1992. *Nature* 359: 387-393.
158. Speck, N. A., B. Renjifo, E. Golemis, T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, and N. Hopkins. 1990. *Genes Dev.* 4: 233-242.
159. Staal, F. J. T., M. Roederer, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9943-9947.
160. Suzow, J., and A. K. Freedman. 1993. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2141-2151.
161. Suzuki, M. 1993. *EMBO J.* 12: 3221-3226.
162. Suzuki, M. 1994b. *Structure* 2: 317-326.
163. Suzuki, M., M. Gerstein, and N. Yagi. 1994a. *Nucl. Acids Res.* 22: 3397-3405.
164. Suzuki, M., and N. Yagi. 1994c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12357-12361.
165. Tanaka, K., K. Chowdhury, K. S. S. Chang, M. Israel, and Y. Ito. 1982. *EMBO J.* 1: 1521-1527.

166. Tanaka, T., K. Tanaka, S. Ogawa, M. Kurokawa, K. Mitani, J. Nishida, Y. Shibata, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1995. *EMBO J.* 14: 341-350.
167. Tautz, D., R. Lehmann, H. Schnurch, R. Schuh, E. Seifert, A. Kienlin, K. Jones, and H. Jackle. 1987. *Nature* 327: 383-389.
168. Thompson, C. C., T. A. Brown, and S. L. McKnight. 1991. *Science* 253: 762-768.
169. Thornell, A., B. Hallberg, and T. Grundström. 1988. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1625-1637.
170. Toledano, M. B., D. Ghosh, F. Trinh, and W. J. Leonard. 1993. *Mol. Cell. Biol.* 13: 852-860.
171. Toledano, M. B., and W. J. Leonard. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4328-4332.
172. Topol, J., D. M. Ruden, and C. S. Parker. 1985. *Cell* 42: 527-537.
173. Tsai, C., and J. P. Gergen. 1995a. Development in press.
174. Tsai, C., and P. Gergen. 1995b. *Development* 121: 453-462.
175. van der Voorn, L., and H. L. Ploegh. 1992. *FEBS lett.*
176. Velcich, A., and E. Ziff. 1985. *Cell* 40: 705-716.
177. Veldman, G. M., S. Lupton, and R. Kamen. 1985. *Mol. Cell. Biol.* 5: 649-658.
178. Verheij, C., C. E. Bakker, E. de Graaff, J. Keulemans, R. Willemsen, A. J. Verkerk, H. Galjaard, A. J. Reuser, A. T. Hoogeveen, and B. A. Oostra. 1993. *Nature* 363: 722-724.
179. Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay. 1982. *EMBO J.* 1: 945-951.
180. Wang, S., and N. A. Speck. 1992. *Mol. Cell. Biol.* 12: 89-102.
181. Wang, S., Q. Wang, B. E. Crute, I. N. Melnikova, S. R. Keller, and N. A. Speck. 1993. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3324-3339.
182. Wanwen, S., B. J. Graves, and N. A. Speck. 1995. *J. Virol.* 69: 4941-4949.
183. Wasylyk, B., J. L. Imler, B. Chatton, C. Schatz, and C. Wasylyk. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7952-7956.
184. Wasylyk, C., J. L. Imler, J. Perez-Mutul, and B. Wasylyk. 1987. *Cell* 48: 525-534.
185. Wasylyk, C., and B. Wasylyk. 1993. *Nucl. Acid Res.* 21: 523-529.
186. Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, and A. M. Weiner. 1988. *Molecular Biology of The Gene* 4th. Edition (The Benjamin/Cummings Publishing).
187. Weiss, D. S., J. Batut, K. E. Klose, J. Keener, and S. Kustu. 1991. *Cell* 67: 155-167.
188. Wharton, K. A., K. M. Johansen, T. Xu, and S. Artavanis-Tsakouas. 1985. *Cell* 43: 567-581.
189. Wolberger, C., A. K. Vershon, B. Liu, A. D. Johnson, and C. O. Pabo. 1991. *Cell* 67: 517-528.
190. Wotton, D., J. Ghysdael, S. Wang, N. A. Speck, and M. J. Owen. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14: 840-850.
191. Wu, C., and M. L. Goldberg. 1989. *Trends in Genet.* 5: 189-194.
192. Wu, J., W. R. Dunham, and B. Weiss. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 10323-10327.
193. Xanthoudakis, S., and T. Curran. 1992a. *EMBO J.* 11: 653-665.
194. Xanthoudakis, S., G. Miao, F. Wang, Y.-C. E. Pan, and T. Curran. 1992b. *EMBO J.* 11: 3323-3335.

195. Xanthoudakis, S., G. G. Miao, and T. Curran. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 23-27.
196. Zaiman, A. L., A. F. Lewis, B. F. Crute, N. A. Speck, and J. L. J. 1995. *J. Virol.* 69: 2898-2906.
197. Zawel, L., and D. Reinberg. 1992. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 448-495.
198. Zhu, X., J. E. Yeadon, and S. J. Burden. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14: 8051-8057.
199. Zu, Y., K. Shigesada, E. Nishida, I. Kubota, M. Kohno, M. Hanaoka, and Y. Namba. 1990. *J. Biochem.* 29: 8319-8324.